家庭薬研究 No.6 26 (1987)

〔原 著〕

ニンジン，セロリの細胞融合について※

藤 井 雅 子　石 黒 文 子
Masako FUJII　Fumiko ISHIGURO
大協薬品工業株式会社 開発課※※

従来バイオテクノロジーの一分野として植物の細胞融合が研究されてきたが，有用な植物がここ数年の進歩で市場に出てきつつある。我々は新しい植物を作り出す手段として，電気融合装置を用いてニンジンとセロリの融合を試み，プロトプラスト単離法，電気融合法，培養法について検討してみた。その結果プロトプラスト単離法と電気融合法について若干の知見を得たので報告する。

実験の部

1. 原材料及び試薬

1) 植 物

高農四寸ニンジン根，金時ニンジン振とう培養細胞，実生セロリ本葉

2) 試 薬

セルラーゼオノズカR−10，マセロザイムR−10，デキストラン硫酸カリウム，カルベニシリンナトリウム，マンニトール，フルオレッセインジアセテート，カルコフルオール

3) 培 地

タバコプロトプラスト用ムラシゲ変更培地[1)]，ムラシゲスクーグ培地

2. 実験方法

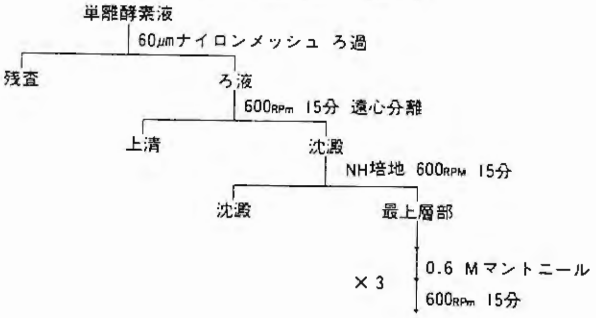
1) プロトプラスト単離法

酵素液は，Table 1のとおりニンジン用とセロリ用で異った酵素液を使用した。酵素処理条件は温度25°で2，4，6時間静置と，同じく温度25°で毎分90回往復振とうで2，4，6時間と6水準の検討を行った。得られたプロトプラストはFig 1の方法で洗浄を行った。

Table 1 プロトプラスト単離酵素液

	ニンジン用酵素液	セロリ用酵素液
Cellulase "ONOZUKA" R10	2 %	1 %
Macerozyme R10	1 %	0.1%
Pottassium Dextran Sulfate	0.5%	0.5%
Carbenicillin Sodium	100ppm	100ppm
Mannitol	0.6M	0.7M
NH medium salts		
pH	5.5	5.5

Fig 1 プロトプラスト洗浄方法



※ 第6回家庭薬開発研究会シンポジウム （富山，1986年11月7日）

※※ 〒939−05 富山市水橋畠等字花井173−3 TEL 0764 (78) 1121

2)　細胞融合法

使用した電気融合装置[2]は富山大工学部畠山等の設計によるもので，交流発生装置と，直流パルス発生装置からなっている。電極は高さ2㎜長さ10㎜の白金板電極で電極間隙は1㎜のものを使用した，交流を加えることによりプロトプラストが内部分極を起こし一連につながるが，周波数は 1MHz とし，電圧は5 V～10 Vの間で最適な条件を検討し30sec 印加した。また直流を加えることにより細胞膜の可逆的誘電破壊が起こり融合すると言われているが，電圧は200 V～ 1000 V，時定数は10 μsec ～ 40 μsec の間で最適な条件を検討した。

3)　プロトプラスト培養法

Fig 2 に示すとおりシャーレ法とドロップ法により行った。シャーレ法は直径 5.5 ㎝のシャーレにプロトプラスト濃度 10×10^4／mℓの培養液を5 mℓ入れ，25° 暗所で24時間培養後ホルモン濃度が5倍の培地を1 mℓ加え25° 300 Luxで30日間培養を行った。ドロップ法はプロトプラスト濃度約 10×10^4／mℓの培養液を直径 3.5 ㎝のシャーレに10 μ 1ずつのドロップにし，さかさにして，25° 暗所で30時間培養後ホルモン濃度が2倍の培地を10 μ 1加え25° 300 Lux で30日間培養を行った。培地はタバコプロトプラスト用ムラシゲ変更培地（ Table 2 ）とムラシゲスクーグ培地を用いた。

4)　染 色 法

生細胞染色と細胞壁の染色はTable 3のとおり行った。

Fig 2　培 養 法

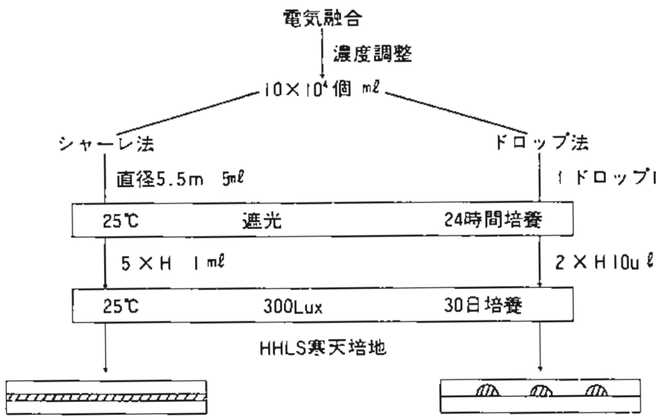


Table 2

Amount per liter of medium, final	NH	5XH	2XH
Salts			
$CaCl_2.2H_2O$	750mg	750mg	750mg
$CoCl_2.6H_2O$	.025	.025	.025
$CuSO_4.5H_2O$	.025	.025	.025
FeNaEDTA	40	40	40
H_3BO_3	3	3	3
KI	.75	.75	.75
KNO_3	2500	2500	2500
$MgSO_4.7H_2O$	250	250	250
$MnSO_4.H_2O$	10	10	10
$Na_2MoO_4.2H_2O$	.25	.25	.25
$NaH_2PO_4.H_2O$	150	150	150
$(NH_4)_2SO_4$	134	134	134
$ZnSO_4.7H_2O$	2	2	2
Organic Constituents			
myo-Inositol	0.1gm	0.1gm	0.1gm
Sucrose	137gm	137gm	137gm
Xylose	0.25gm	0.25gm	0.25gm
Nicotinic acid	1mg	1mg	1mg
Pyridoxine-HCl	1	1	1
Thiamine-HCl	10	10	10
Benzylaminopurine	0	5mg	2mg
Naphthalene Acetic Acid	0	15	6mg
pH (before autoclaving)	5.8	5.8	5.8

Table 3　染 色 法

	染色液濃度	測定波長 (nm) 励起	蛍光	CF
生細胞染色	Fluolescein diacetate 0.001% (Ald)	330-500	500	530
細胞壁染色	Calcofluor 0.001% (Amer. Cyanide)	365	435	470

実験結果

1.　プロトプラスト単離

セロリ本葉由来プロトプラストはTable 1 のセロリ用酵素液を用い25° 4時間静置処理した時に得られたプロトプラストが最も細胞融合の効率がよかった。四寸ニンジン根由来プロトプラストは

Table 1のニンジン用酵素液を用い，25°，6時間静置処理した時に得られたプロトプラストが最もよかった。ニンジン振とう培養細胞由来プロトプラストは，25° 4時間毎分90回往復振とう処理した時に得られたプロトプラストが最もよかった。(Table 4)

2. 細胞融合

四寸ニンジン根由来プロトプラストとセロリ本葉由来プロトプラストの融合条件は，Table 5に示すとおり交流は周波数1MHzで電圧10Vの電流を30sec印加し，続けて電圧400 V時定数40μsecの直流パルスを印加するのが最もよく，その融合率は20回行った平均で約10%の異属間融合がおこった。またニンジン振とう培養細胞由来プロトプラストとセロリ本葉由来プロトプラストの融合を同条件で行ったところ，融合が起こらず直流電圧を500 V～600 Vに上げるとセロリプロトプラストは破裂しニンジンプロトプラストだけが残った。

Table 4　酵素処理条件

温度25°

	2 時 間	4 時 間	6 時 間
静　置		セロリ	四寸ニンジン
90回／分		サスペンジョンニンジン	

Table 5　融 合 条 件

	四寸ニンジン―セロリ	サスペンジョンニンジン―セロリ
交流周波数	1MHz	1MHz
交流電圧	10V	10V
交流印加時間	30sec	30sec
直流電圧	400V	600V
直流時定数	40us	40us

3. プロトプラスト培養

四寸ニンジン根由来プロトプラストとセロリ本葉由来プロトプラストの融合後の混合プロトプラストをタバコプロトプラスト用ムラシゲ変更培地でシャーレ法とドロップ法により培養した。24時間後染色し観察すると，細胞壁の再生が確認された。更に観察を続けたが分裂を確認することができず生細胞染色を行ってみたがほとんどの細胞は死滅していた。一方ニンジン振とう培養細胞由来プロトプラストとセロリ本葉由来プロトプラストの融合後の残存ニンジンプロトプラストをムラシゲスクーグ培地でシャーレ法により培養してみたところ30日目でコロニーを観察することができた。

考　察

プロトプラスト単離，細胞融合の条件については若干の知見を得たが，今回の最終目的であるプロトプラストの培養が十分検討できなかった。今後はプロトプラストの細胞分裂の確率を高めるために培養法のみでなく，プロトプラスト単離法，電気融合法も関連づけて検討したい。その一方法として，細胞壁が一部残っている細胞は細胞壁の再生が早かったのでそのような細胞を融合するために高電圧，短時間パルスをプロトプラストに印加してみたい。

文　献

1) Eussell Matmberg, Joachim Messing : Molecular Biology of plants　1884

2) 中村，畠山，八木: 信学技報　MBE84－15．65 (1984)

家庭薬研究 No.6　29（1987）
〔原　著〕

マンネンタケ Ganoderma lucidum の研究（その3）※

——— 細胞毒性画分の成分について ———

藤　田　章　夫
Akio FUJITA
第一薬品工業株式会社　研究開発部※※

マンネンタケGanoderma　lucidum KARST または，その近縁種の子実体を乾燥した霊芝は，古来から不老長寿の霊薬として珍重されてきた漢薬である。中国では滋補強壮薬として，神経衰弱，高血圧症，慢性肝炎，気管支喘息，リウマチ性関節炎などに使用されている。[1] 薬理作用としては，血圧降下，高脂血症改善，抗癌作用等を有すると報告されている。[2~4] その成分は，多糖類，脂肪酸などの他，最近数多くのラノスタン系トリテルペノイドが報告されている。[5~7]

先に我々はマンネンタケの研究として，数種の酵素阻害作用，人癌培養細胞増殖抑制作用，抗炎症作用，犬の動脈血圧に対する影響などの生理活性の検討，及び5種の新トリテルペノイド（Ⅰ－Ⅴ）について報告した。[8~10]今回，人癌培養細胞ＫＢに対する細胞毒性画分より更に4種の成分はＶＩ－ＩＸを得たので，それらの構造について報告する。

実験の部

1. 使用機器及び測定条件

融点は未補正，柳本微量融点測定器，ＵＶはHitachi 220 S，ＩＲはHitachi 260－10ＩＲ spectrometerを用い測定した。^{1}H－NMRおよび ^{13}C－NMRは Varian XL－200（200 MHz，50.3 MHz）にて測定し，ＴＭＳを内部標準とし，chamical shift はδ値（ppm）で示し，結合定数（J）はHzで表わした。略号：s＝singlet，d＝doublet，dd＝doublets of doublet，t＝triplet，q＝quartet，m＝multiplet，MSはＪＥＯＬ　ＪＭＳ－D－200を使用し，70eVにて測定した。ＴＬＣは，Kiesel gel 60F254（Merck）を使用し，展開溶媒はクロロホルム－メタノール（99：1），n－hexane－EtoAc（10：3）を用いた。発色は10％H_2SO_4 を噴霧し加熱発色によった。カラムクロマトグラフィーはKiesel gel 60（70－230mesh，Merck）を用いた。

2. 抽出と分離

富山県八尾町栽培のマンネンタケ子実体を5倍量のメタノールにて一昼夜冷浸し濾過，この操作を3回繰返し，濾液を合し減圧濃縮して乾固しメタノール抽出エキスを得た。これに$CHCl_3$－H_2O を加えて抽出分画し $CHCl_3$ 層と H_2O 層を得た。$CHCl_3$層は減圧濃縮後，90％MeOH－石油エーテル（ＰＥ）で抽出分画し，90％MeOH画分とＰＥ画分を得た。90％MeOH画分をシリカゲルカラムクロマトに付し，$CHCl_3$，1％MeOH－$CHCl_3$，2％MeOH－$CHCl_3$，5％MeOH－$CHCl_3$，10％MeOH－$CHCl_3$，MeOH溶出部に分画した。$CHCl_3$溶出部は

※　第6回家庭薬開発研究会シンポジウム発表　（富山，1986年11月7日）

※※ 〒930　富山県富山市奥田町6－10　　TEL　0764（32）8571

更にシリカゲルカラムクロマトに付し，n－hexane－AcOEt 混液の比率を順次変えながら展開し，n－hexane－AcOEt（4：1）溶出部より化合物VI－VIIIを得た。また前報Vの母液を無水酢酸とピリジンで常法によりアセチル化後，PLCにて精製しIXを得た。

3. 培地および試薬

Eagle's MEM培地は日水製薬製，仔牛血清は半井化学製，tripsin，EDTA，crystal violet は和光純薬製を用いた。その他の試薬はいずれも常用の特級試薬を用いた。

4. 抗癌効果検定法（in vitro）

人鼻咽腔癌由来のKB細胞を用い，J. E. GradyらのCrystal Violet（CV）法に準じて行った。[12] 仔牛血清を10%添加したMEM培地を培養液として用い，2－3×10^4 cell／mℓのKB細胞浮遊液を調整する。細胞浮遊液を3.9mℓずつ試験管に分注し，被検化合物溶液0.1mℓを添加し，ふ卵器（37℃）内で72時間培養する。被検化合物は4％DMF（N，N－dimethyl formamid）溶液とし3段階の濃度で検定した。1 dose につき3検体とし，blank は4％DMF溶液を加えたものと，培地のみ分注したものとを同様に処理した。72時間培養後，各試験管に0.025％CV水溶液を1mℓ加えて染色し，過剰の色素を生理食塩水にて洗浄する。染色された細胞を3mℓの50％EtOHで処理しCVを溶出させO.D. 570 nm の吸光度を測定した。

増殖抑制率（％）は①式により算出した。

$$\text{Inhibition}\ (\%) = \frac{A - B}{A - C} \times 100 \quad \cdots\cdots\cdots ①$$

A：O.D. of blank，　B：O.D. of sample，
C：O.D. of no cell

5. 化合物VIの性状

mp 180～182℃（n－hexane）の無色針状晶。

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3350，2960，1660，1455，1380，1050。MS m/z：428（M^+），410，396，363，337，301，253，251。

^{1}H－NMR（$CDCl_3$）δ：0.82（6H，s），0.82（3H，d，J＝6.2Hz），0.87（3H，d，J＝7.0Hz），0.91（3H，d，J＝7.2Hz），1.00（3H，d，J＝6.3Hz），3.96（1H，m），5.21（2H，t，J＝6.5Hz），6.27（1H，d，J＝8.5Hz），6.54（1H，d，J＝8.3Hz）。

標品 ergostelol peroxide との直接比較（TLC，IR）にて一致。

6. 化合物VIIの性状

mp 137～139℃（Me_2CO）の無色針状晶。$C_{30}H_{44}O_3$（High MS，Calcd. $C_{30}H_{44}O_3$：452.3288，Found：452.3308）。

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3410，2980，1710，1680，1460，1380。UV λ_{max}^{MeOH} nm（log ε）：217（3.98），234（3.88），242（3.84），251（3.71）。

MS m/z：452（M^+），437，309，269。^{1}H－NMR（$CDCl_3$）δ：0.60（3H，s），0.88（3H，s），0.94（3H，d，J＝6.2Hz），1.09（3H，s），1.13（3H，s），1.20（3H，s），1.84（3H，s），5.41（1H，m），5.52（1H，m），6.91（1H，m）。

^{13}C－NMR（$CDCl_3$）δ：11.99（q），15.71（q），18.30（q），22.06（q），22.47（q），23.67（t），25.33（q），25.42（q），25.92（t），27.89（t），31.45（t），34.85（t），35.98（t），36.14（d），36.61（t），37.19（s），37.77（t），43.77（s），47.50（s），50.31（s），50.69（d），50.83（d），117.19（d），119.97（d），

126.65 (s), 142.77 (s), 144.48 (s), 145.80 (d), 173.23 (s), 217.15 (s)。

7. 化合物 VIII の性状

mp 212～213 ℃ (Me_2CO) の無色針状晶。

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3430, 2930, 1690, 1640, 1260。

UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ε) : 219 (4.27), 234 (4.22), 242 (4.20), 251 (4.02)。

MS m/z : 454 (M^+), 436, 421, 394, 311, 271, 253。

^{1}H－NMR (pyridine－d^5) δ : 0.68 (3H, s), 0.98 (3H, d, J＝6.0 Hz), 1.02 (3H, s), 1.11 (3H, s), 1.14 (3H, s), 1.22 (3H, s), 2.11 (3H, s), 3.47 (1H, dd, J＝6.8, 8.4 Hz), 5.42 (1H, m), 5.59 (1H, m), 7.20 (1H, m)。

^{13}C－NMR (pyridine－d^5) δ : 12.69 (q), 15.80 (q), 16.49 (q), 18.36 (q), 22.92 (q), 23.35 (t), 25.67 (q), 25.76 (t), 27.99 (q), 28.51 (t), 28.67 (d), 31.70 (t), 35.19 (t), 36.15 (t), 36.25 (d), 37.61 (t), 37.85 (s), 39.16 (s), 43.92 (s), 49.55 (d), 50.48 (s), 50.96 (d), 77.85 (d), 116.24 (d), 120.89 (d), 128.70 (s), 142.18 (d), 142.67 (s), 146.38 (s), 170.34 (s)。

8. 化合物 IX の性状

mp 132～135 ℃ (MeOH) の無色針状晶。 $C_{36}H_{54}C_7$ (High MS, calcd。 $C_{36}H_{54}C_7$: 598.3867。 Found : 598.3881)。

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 2930, 1740, 1710, 1370, 1230。

UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ε) : 235 (4.12), 242 (4.17), 251 (4.00)。

MS m/z : 598 (M^+), 538, 495, 436, 309。

^{1}H－NMR ($CDCl_3$) δ : 0.59 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.91 (3H, d, J＝6.2 Hz), 1.09 (3H, s), 1.13 (3H, s), 1.20 (3H, s), 1.51 (3H, s), 2.02 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.78 (H, m), 4.31 (1H, d, J＝12.2 Hz), 4.48 (1H, d, J＝12.2 Hz), 5.28 (1H, dd, J＝2.6, 9.7 Hz), 5.39 (H, m), 5.51 (1H, m)

結果及び考察

マンネンタケの子実体をメタノールで抽出し，Chart 1 に示した手順にしたがって分画し，水可溶部，石油エーテル可溶部，90%メタノール可溶部を得た。

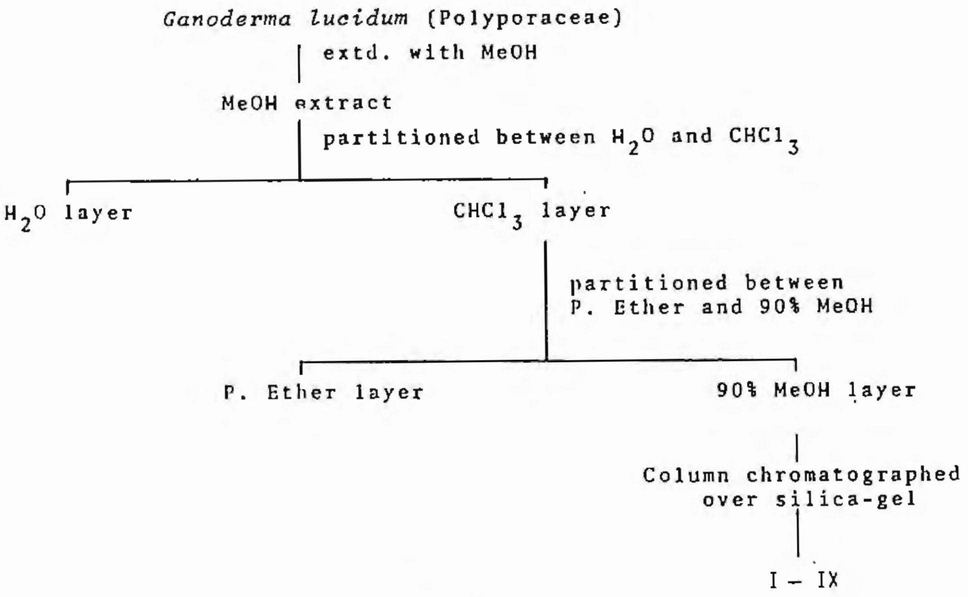
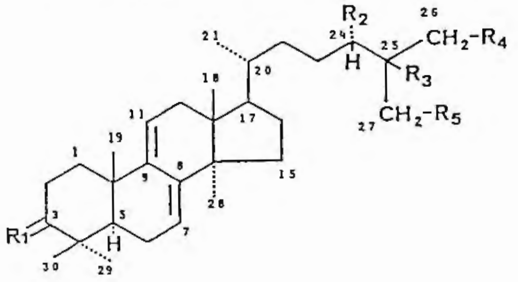
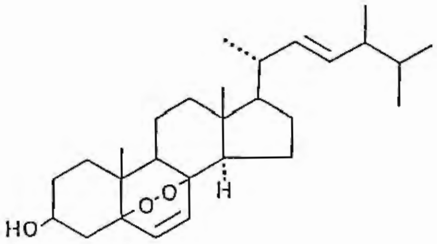


Chart 1

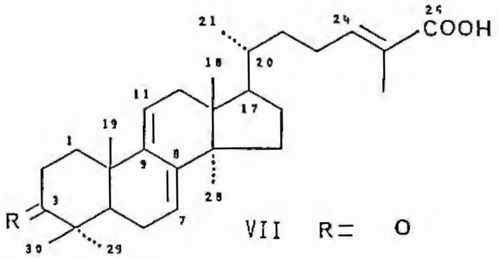
このうちKBに対する細胞毒性が最も強かった90%メタノール可溶部につき，実験の部に記載するように分離，精製を行い4種の化合物 VI － IXを単離した。



	R1	R2	R3	R4	R5
I	O	$\Delta^{24(25)}$		OH	H
II	---H / —OH	$\Delta^{24(25)}$		OH	H
III	---H / —OH	$\Delta^{24(25)}$		OH	OH
IV	O	OH	OH	H	H
V	O	OH	OH	OH	H
IX	O	OAc	OAc	OAc	H



VI



VII R= O

VIII R= ---H / —OH

Fig 1

化合物VI は，mp 180 ～ 182 ℃の無色針状晶でLiebermann － Burchard (L. － B.) 反応は陽性である。赤外線吸収 (IR) スペクトルにおいて水酸基および二重結合に基づく吸収を認める。MSスペクトルでは，m/z 428 にM^+ を持ち，その他 m/z 396 (M－32) にフラグメントピークを示す。プロトン核磁気共鳴 (^{1}H－NMR) スペクトルでは，δ 5.21 (2 H，t，J＝6.5 Hz)，δ 6.27 (1 H，d，J＝8.5 Hz) およびδ 6.54 (1 H，d，J＝8.5 Hz) にビニル基，δ 3.96 (1 H，m) に水酸基の根本のメチンプロトンに基づくシグナルがみられ，その他 doublet メチル4個，singlet メチル2個およびメチレン，メチンに基づくと思われるシグナルがみられる。

以上のことより，VI は ergosterol peroxide と予想され，標品との IR，薄層クロマトグラフィー (TLC) の比較にて同定した。

化合物VII は，mp 137 ～ 139 ℃の無色針状晶でL.－B. 反応は陽性である。IRスペクトルで 3430 cm^{-1} および 1680 cm^{-1} にカルボン酸に基づくと考えられる吸収が認められる。UVスペクトルはI－Vに類似しており lanosta－7，9 (11)－dien の骨格を持つと考えられた。MSスペクトルに於て m/z 452 に分子イオンピークが認められ，その他 m/z 309，269 にフラグメントピークが存在する。^{1}H－NMRスペクトルはIに類似しており，5個の singlet メチル基，1個の doublet メチル基，1個のビニルメチル基，3個のビニルプロトンに基づくシグナルが認められたが，Iにみられた26位ヒドロキシメチル基に基づくシグナルは認められない。さらに ^{13}C－核磁気共鳴 (^{13}C－NMR) スペクトルにおいてδ 217.15 (s)，δ 173.23 (s) ppmのシグナルはそれぞれ3位ケトン，26位カルボン酸に帰属された。

以上より，VII を 3－oxo－lanosta－7，9 (11)，24 trien－26－oic acid と推定した。[11]

化合物VIII は，mp 212 ～ 213 ℃ の無色針状晶で，L.－B. 反応は陽性である。IR，UVスペクトルは VII に類似しているが，IRスペクトルで VII にみられた環状ケトンに基づく吸収は認められない。また，MSスペクトルに於て m/z 454 に分子イオンピークが認められた。^{1}H－NMRスペ

クトルでは，VⅡと同様7個のメチル基，3個のビニルプロトンに基づくシグナルが認められ，その他δ3.47ppmに3位水酸基の根本のメチンプロトンに基づくと考えられるシグナルが認められる。

以上のことから，VⅢを3－hydroxy－lanosta，7，9（11），24 trien－26 oic acid（ganoderic acid Y）と推定した。[5]

また，先に報告したVの母液をアセテル化後TLCにて精製し，$C_{36}H_{54}O_7$，無色針状晶，mp 132～135℃化合物IXを得た。IXはL.－B.反応陽性でUVスペクトルはVに類似している。^{1}H－NMRスペクトルでは，3個のアセチル基に基づくシグナルが認めらVのdiacetate[10]に比べ，24位メチンプロトン，26位ヒドロキシメチルプロトンがそれぞれδ5.28（1H，dd，J＝2.6，9.7 Hz），δ4.48（1H，d，J＝12.2Hz），δ4.48（1H，d，J＝12.2Hz）と低磁場シフトする以外は類似している。

以上のことよりIXはganodermanontriol triacetateと推定した。なお，24位および25位の立体については未決定である。また，IXはアセチル化の過程で加熱しているので，artifactの可能性がある。

今回，90%メタノール可溶部より得られた4種の成分の細胞増殖抑制活性について検討したところ，VIのergosterolperoxideはED$_{50}$，7.1 μg/mlを示し，VⅡ，VⅢはそれぞれ，ED$_{50}$，26.5μg/ml，27.0μg/ml とそれ程強い活性は認められなかったが，ともに50μg/mlの濃度では，ほぼ100%に近い増殖抑制率を示した。なお，VⅢのganoderic acid Yについては，rat hepatoma cellに対しても1×10^{-4} Mの濃度で強い増殖抑制活性を示すことが報告されている。[5]

また，VⅡ，VⅢについては，アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害作用を有する報告もなされており，[11] 今まで得られた一連のトリテルペノイドについてのACE阻害活性に興味がもたれた。

謝　　辞

本研究は富山医科薬科大学薬学部にて行ったものであり，御指導頂きました森田直賢教授，有澤宗久博士に心より感謝致します。

参考文献

1) Chiang Su New Medical college ed., Zhong-yao-da-ci-dian, Shanghai Scientific Technologic Publisher, shanhai, P. 1180, (1977).

2) 有地　滋，鎔　忠人，久保道徳，松田秀秋，吉村成年，桐ヶ谷紀昌：霊芝（Ganoderma lucidum）子実体の研究，基礎と臨床，**13**，4239（1979）.

3) 久保道徳，松田秀秋，田中基晴，木村善行，鎔　忠人，有地　滋，奥田拓道，桐ヶ谷紀昌　霊芝の研究（第3報），基礎と臨床，**14**，27（1980）.

4) T. Miyazaki and M. Nishijima; Studies on Fungal Polysaccharides, XXVII. Structural Examination of a Watersoluble, Antitumor Polysaccharide of Ganoderma lucidum, Chem・Pharm・Bull・, **29**, 3611 (1981).

5) J. O. Toth, B. Luu, and G. Ourisson; LES ACIDES GANODERIQUES TàZ : TRITERPENS CYTOXIQUES. DE GANODERMA LUCIDUM (Polyporacée), Tetrahedron Letters, 24, 1081 (1983).

6) T. kikuchi, S.Matsuda, S. Kadota, Y. Murai, and Z. Ogita; GANODERIC ACID D, E, F. AND H AND LUCIDENIC ACID D, E, AND F, NEW TRITERPENOIDS FROM GANODERMA LUCIDUM, Chem. Pharm. Bull., **33**, 2624 (1985).

7) T. Kikuchi, S. Matsuda, Y. Murai, and Z. Ogita; GANODERIC ACID G AND I AND GANOLUCIDIC ACID A AND B, NEW TRITERPENOIDS FROM GANODERMA LUCIDUM, Chem. Pharm. Bull., **33**, 2628 (1985).

8) 藤田章夫，福村秀樹，林　利光，有澤宗久，清水岑夫，森田直賢，百瀬弥寿徳，武田龍司中西頴央，マンネンタケGanoderma lucidum KARST. の研究（その１），生理活性の検討，日本薬学会北陸支部第65回例会講演要旨集，11（1985）

9) M. Arisawa, A. Fujita, M.Saga, H. Fukumura, T. Hayashi, M. Shimizu, and N. Morita, THREE NEW LANOSTANOIDS FROM GANODERMA LUCIDUM; J. Nat. Prod., **49**, 621 (1986)

10) A. Fujita, M. Arisawa, M. Saga, T. Hayashi, and N. Morita, TWO NEW LANOSTANOIDS FROM GANODERMA LUCIDUM; J. Nat. prod., in press.

11) 森際愛子，北畠克顕，藤本善徳，池川信夫，アンジオテンシンーⅠ－変換酵素の阻害活性を有するトリテルペン成分について；日本生薬学会第32回年会講演要旨集，42（1985）.

12) J. E. Grady, W. L. Lummis; and C. G. Smith, An Improved Tissue Culture Assay III. Alternate Methods for Measuring Cell Growth; Cancer Research, **20**,1114 (1960).

家庭薬研究 No.6 35（1987）

〔原 著〕

ぬるかぜ薬（ＩＫＤ－5910）の検討※

富樫 茂 Shigeru TOGASHI　中橋 孝 Takashi NAKAHASHI　荒川雄一 Yuichi ARAKAWA
鹿熊 武 Takeshi KAKUMA　藤縄知昭 Tomoaki FUJINAWA　森井 勇 Isamu MORII
株式会社池田模範堂 研究所，開発部※※

最近 transdermal therapeutic system に強い関心がもたれ，多種多様な薬物の経皮吸収型製剤の開発研究が盛んに行われている。

今回，かぜの諸症状の緩和を目的とした新しい外用剤の開発に当り*dℓ*－カンフル，*ℓ*－メントール，ウイキョウ油，ニクズク油などの芳香性生薬成分等で処方されたぬるかぜ薬ＩＫＤ－5910について薬効薬理学的に検討した。

本論文ではぬるかぜ薬IKD－5910の処方決定に至る基礎研究と吸収経路の検討，さらにかぜの諸症状と関連すると考えられる各種薬効薬理試験成績および各種毒性試験成績について報告する。

実験材料

1. 使用動物

薬効薬理試験にはモルモット，ラットおよびマウスを用い，毒性試験にはラット，モルモットおよびウサギを用いた。これら動物は室温21～25℃，湿度40～80％の飼育室にて１週間以上の予備飼育の後，健常な動物のみを用いた。これら動物には固型飼料（ウサギ：RM－３三協ラボサービス，モルモット：GM－３三協ラボサービス，ラット・マウス：CE－２日本クレア）および自家水道水を与えた。

2. 被被体

dℓ－カンフル（長岡実業），*ℓ*－メントール（長岡実業），ユーカリ油（長岡実業），テレビン油（長岡実業），ニクズク油（小川香料），ウイキョウ油（日進香料）をＩＫＤ－5910の油性軟膏基剤に単独または配合剤として用いた。薬効試験の比較対照薬としては類似既市販品(Ｖ)の他に dihydrocodeine phosphate（大日本製薬），Inteban cream（住友製薬），indome－thacin（SIGMA），*dℓ*－isoproterenol hydrochloride（日本商事）および diphe－nhydramine hydrochloride（金剛化学）を用いた。毒性試験の対照薬としては日局親水軟膏，1％ 2,4－dinitrochlorobenzene（DNCB，和光純薬）ワセリン軟膏，2％ 8－methoxypsoralen（8－MOP，東京化成）アセトン溶液，6％酢酸（和光純薬）を用いた。

実験方法

Ⅰ 薬効薬理試験の部

1. 器械的刺激法による鎮咳試験

※ 第６回家庭薬開発研究会シンポジウム発表 （富山，1986年11月７日）

※※ 〒930－03 富山県中新川郡上市町横法音寺24　TEL 0764（72）1133

1) 経皮投与試験

高木ら[1]の方法に従って行った。体重310～560gのHartley 系雌雄モルモット(静動協および紀和実験動物)を用いた。頸部および胸部の毛を電気バリカン(サンフレンドケミカル)で刈り，さらに電気カミソリ(Braun synchron)で剃毛し，背位固定後，気管の一定部位に小孔を開けた。その5分後と20分後に刺激毛(ブタ毛)を気管内に挿入し，咳をすることを確めた後，被検体750mg/kgを剃毛胸部の3cm×4cmにヘラを用い1分間塗擦した。その後15, 30, 60, 90および120分後に刺激し咳発生の有無を観察した。5回のうち1回でも咳をしなかった場合を有効とし，5回とも咳をした場合は無効とした。

2) 吸入投与試験

体重420～530gのHartley 系雄性モルモット(紀和実験動物)を用いた。実験はFig 1に示した吸入実験装置にて行った。すなわち，前記同様，頸部および胸部の毛を剃毛し，背位固定後気管に小孔を開け直ちに容積13.7ℓのchamber内へ移した。5分後と20分後に操作口から，前記同様に刺激した。咳発生の有無はchamberに装着した聴診器にて確認した。被検体750mg/kgまたは1,500mg/kg相当量を展延し，揮散薬物はエアーポンプを介して動物の鼻先に噴出し続けた。吸入開始後，前記実験と同様にして鎮咳効果を評価した。chamber内温度は24～25℃にコントロールした。

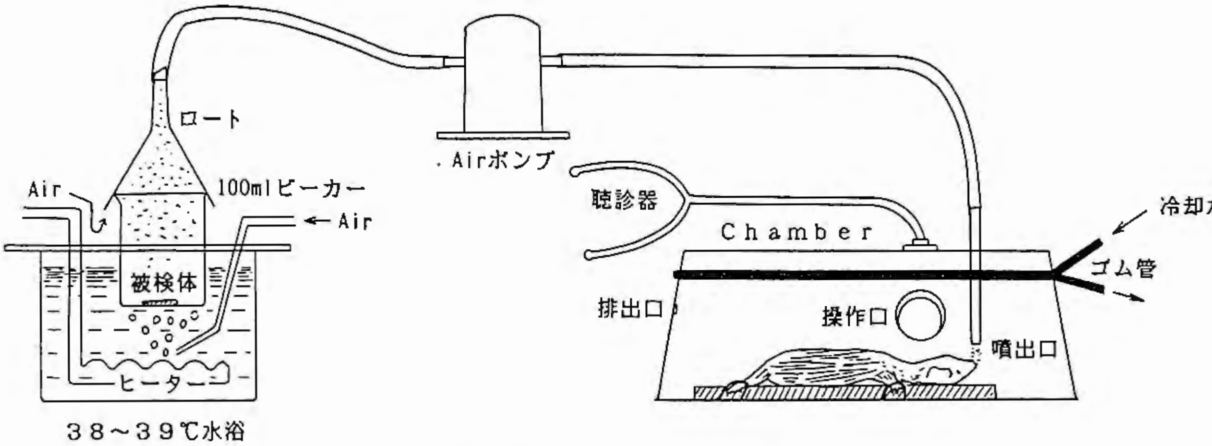


Fig 1　吸入実験概略図

2. 気道分泌法による去痰試験

江田ら[2]の方法に準拠して行った。体重228～279gのLWH－Wistar 系雄性ラット(富山実験動物)の胸部の毛を前もって剃毛した。被検体750mg/kgは0.6%フェノールスルホンフタレイン(第一製薬)1mℓ/kg静脈注射の60分前と30分前に，剃毛胸部の3cm×3cmにヘラを用い1分間塗擦した。塗擦後は小型金網ケージ(直径約5cm，長さ約25cm)に入れた。色素静注30分後放血致死させ開胸し，直ちに気管カニューレを挿入した。このカニューレに38℃に加温した5%$NaHCO_3$溶液5mℓを入れた注射筒を連結した。この液3mℓを徐々に気道内に注入し，10分後吸引し直ちに再度同量注入した。2回目以降は5分ごと4回，計5回気道内洗浄を行った。得られた洗浄液に5N－HCl を微量加えpHを8.0～8.1に調整後，7,000rpm，20分遠心分離し上清を558nmで比色し色素量を算出した。

3. イースト発熱法による解熱試験

体重166～212gのLWH－Wistar 系雄性ラット(富山実験動物)の腹部の毛を剃毛後，電子体温計(立石電機)で直腸温を測定した。次に腰部皮下に15%yeast (和光純薬)を1mℓ/100g

投与し，18時間後直腸温を測定し，0.4℃以上の発熱を示したラットを選択して用いた。被検体100㎎を剃毛腹部の2㎝×2.5㎝にヘラを用い30秒間塗擦し，その部位をサージカルテープ（Blenderm，3M）にて密封し，さらに剥離防止のためシルキーテックス（東京衛材研究所）で保定した。動物はそのままの状態で1時間ごと5時間後まで直腸温を測定した。

4. 酢酸 writhing 法による鎮痛試験

石河ら[3]の方法に準拠して行った。体重22～25gのStd：ddY系雄性マウス（静動協）の腹部の毛を前もって剃毛して用いた。剃毛腹部に被検体50㎎を直径1.5㎝の円形状にヘラを用い30秒間塗擦し，直ちにパッチテスト用絆創膏（鳥居薬品，スモールサイズ）を貼付し，さらにシルキーテックスで保定した。2時間後それらを剥離し，0.7%酢酸0.1㎖/10g腹腔内投与した。酢酸投与10分後より10分間の writhing 回数を数えた。

5. カラゲニン胸膜炎法による抗炎症試験

Katoriら[4]の方法に準拠して行った。体重198～229gのKWH－Wistar系雄性ラット（紀和実験動物）の胸部の毛を前日に刈毛，エバクレームS（東京田辺）で脱毛処理し，当日さらに被検体塗擦直前にセロファンテープで5回 strippingした。被検体100㎎は，1%λ－carrageenin（Picnin－A，逗子化学研究所）0.3㎖を右胸腔内に投与する3時間前と投与直後に，それぞれ剃毛胸部の3㎝×3.5㎝にヘラを用い30秒間塗擦した。塗擦後はサランラップで胸部を覆い，さらにシルキーテックスで保定し小型金網ケージに入れた。carrageenin投与3時間後放血致死させ開胸し，淡黄色の胸水を採取し2,000rpm，5分間の遠心分離後容量を測定した。

6. チオペンタール睡眠延長作用による鎮静試験

体重21～25gのStd：ddY系雄性マウス（静動協）の腹部の毛を前もって剃毛して用いた。被検体20㎎を剃毛胸部の2㎝×2㎝にヘラを用い30秒間塗擦し，その部位をシルキーテックスで保定した。30分後保定を除去し，直ちにチオペンタール（田辺製薬）50㎎/㎏を腹腔内投与した。睡眠時間は正向反射の消失時間と回復時間の差より求めた。

7. 呼吸運動の観察

体重436～509gのHartley系雄性モルモット（静動協）の胸部の毛を剃毛し，ウレタン1.2g/㎏の腹腔内注射で麻酔後，背位固定し，Y字型カニューレを気管に挿入した。カニューレをマレイーのタンブールに連結し，タンブールの動きをヘーベルを介して記録した。被検体投与の10分前と5分前に正常呼吸運動を記録後，被検体750㎎/㎏を鎮咳試験同様剃毛胸部の3㎝×4㎝にヘラを用い1分間塗擦した。その後5，10，20，30，45および60分後に呼吸運動を記録し，被検体塗擦前の正常呼吸回数および呼吸換気量と比較した。呼吸数は振幅数を数え，呼吸換気量は下記の式により各測定時間ごとの1分間当たりの記録より相対量として求めた。

$$\text{呼吸換気量}(m\ell) = \frac{\text{呼吸運動の振幅の各頂点を結んだ用紙重量}}{\text{空気}1\,m\ell\text{を負荷した時の用紙重量}} \times \text{呼吸回数}$$

Ⅱ 毒性試験の部

1. 経皮急性毒性試験

体重130～204gのSlc：Wistar系雌雄ラット（静動協）およびSlc：Hartley系雌雄モルモット（静動協）を1群5匹として用いた。両動物とも前もって背部から腹部の毛を広く刈り，被検体16g/㎏をラットの雄では10㎝×6㎝，雌では10㎝×5㎝，モルモットの雄では12㎝×7㎝，雌では12㎝×6.5㎝にヘラを用い1分間塗擦した。直ちに適用部にガーゼを当て，さらにシルキーテックスで被覆した。24時間後被検体を洗浄除去した。一般症状は適用後の0.5，1，3および5時間を含め14日後まで毎日観察した。14日後生存例すべてを剖検し，臓器および組織の肉眼的観察を

行ったのち，一部臓器の病理組織学的検索を行った。LD_{50}は14日後の死亡数より求めた。

2. 皮膚一次刺激性試験

体重 311 ～ 373 gのStd：Hartley系雌雄モルモット（静動協）を用いた。あらかじめ背部から両腹側部の毛を剃毛し，皮膚状態の良好な動物10匹ずつの背部を区分し，各区画ごとに被検体20mgを直径約1.5cmの円形状にヘラを用い30秒間単純塗擦した。塗擦後1，3，5，24，48および72時間後にTable 1のDraize[5]の判定基準に従って皮膚症状を評価した。

Table 1　Draizeの判定基準

皮膚反応の程度	評点
1）紅斑と痂皮形成	
紅斑なし	0
ごく軽度の紅斑（やっと認められる程度）	1
明らかな紅斑	2
中等度から強い紅斑	3
深紅色の強い紅斑に軽い痂皮形成（傷害は深部に）	4
2）浮腫形成	
浮腫なし	0
ごく軽度の浮腫（やっと認められる程度）	1
明らかな浮腫（周囲と明らかに区分可能）	2
中等度の浮腫（1mm程盛り上がっている）	3
強い浮腫（1mm以上盛り上がり、周囲にも広がる）	4

3. 累積皮膚刺激性試験

体重 308 ～ 372 gのStd：Hartley系雄性モルモット（静動協）を用いた。あらかじめ背部から両腹側部の毛を剃毛し，皮膚状態の良好な動物10匹の背部を区分し，各区画ごとに被検体30mgを直径約2cmの円形状にヘラを用い30秒間単純塗擦した。被検体は1日1回連続28日間ほぼ一定時刻に同一部位に塗擦した。刺激性の評価はTable 1の基準に従い1日1回被検体適用の直前に行った。

4. 皮膚感作性試験

佐藤ら[6]のmodified guinea pig maximization methodに準拠して行った。体重 327 ～ 402 gのSlc：Hartley系雄性モルモット（静動協）を1群10匹として用いた。頸背部の毛を剃毛し，剃毛部の2cm×4cmの4隅に実験直前にFreund's complete adjuvant（Difco）を等量の滅菌蒸留水でエマルジョン化したE－FCAを0.1mlずつ皮内注射し，注射部位上の皮膚に＃型の擦傷をつけたのち，被検体100mgずつパッチテスト用絆創膏に塗り貼付した。さらにシルキーテックスで24時間保定した。この＃型擦傷と被検体の適用はその後2日間計3日連続して行った。実験開始7日後，再び頸部を剃毛し10％ラウリル硫酸ナトリウム含有ワセリンを塗布した。塗布24時間後，炎症部を微温水で軽く拭き，被検体200mgを2cm×4cmの濾紙を用いて頸部に密着させ，48時間シルキーテックスを用い閉塞適用した。なお，非感作群は無処置のままとした。

感作開始21日後，感作群と非感作群の動物の腹側部の毛を剃毛し，感作群と非感作群の動物に被検体20mgを直径1.5cmの円形状にヘラを用い30秒間単純塗擦した。誘発24，48および72時間後にTable 1の基準に従い皮膚症状の評価を行った。

5. 光毒性試験

体重 330 ～ 371 gのStd：Hartly系雄性モルモット（静動協）を用いた。あらかじめ背部から両腹側部の毛を剃毛し，皮膚状態の良好な動物10匹の背部正中線を境とし，対称に1.5cm×1.5cmの区画を3区画設けた。各区画に被検体50mgまたは0.05ml適用し，30分後片面をアルミホイルで被覆し，Black light（FL20S－BLB，波長315～400nm，東芝）5本を用い3mm厚のガラス板を介し，背部皮膚面上10cmの距離から30分間照射した。照射24，48および72時間後に光照射部と非照射部の皮膚症状をTable 1の基準に従い判定した。

6. 眼粘膜刺激性試験

体重2.9～3.5kgのStd：NZW系雄性ウサギ（静動協）のうち眼に異常のないことを確認したものを用いた。各被検体ごと6匹とし，そのうち3匹は被検体適用後生理食塩水で洗浄する洗浄群と

し，他の3匹は非洗浄群とした。洗浄群は被検体100㎎または0.1㎖を右眼瞼嚢内に適用後，直ちに軽くマッサージし15秒後20㎖の微温生理食塩水で噴射洗浄した。適用後1，3，5時間および1，2，3，5，7日後にDraize[5] の判定基準に従って肉眼的に判定した。さらにその結果を基にKay and Calandraの眼粘膜刺激分級法[7]に従って刺激性の等級付けを行った。

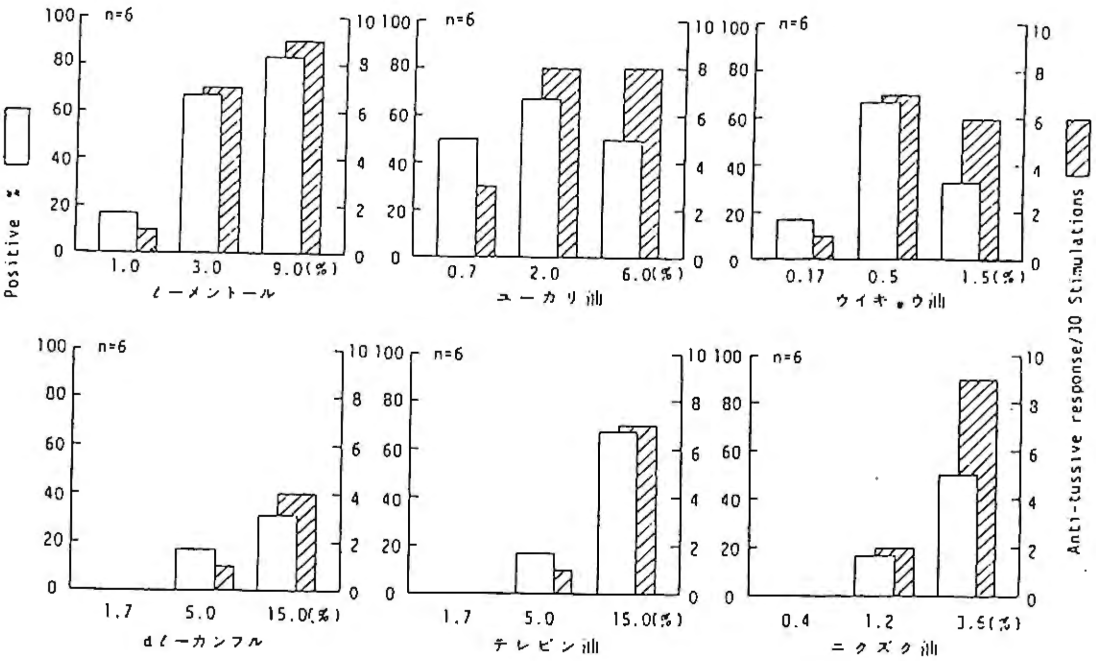
結　　果

I　薬効試験の部

1.　IKD－5910 配合単独成分の効果

1)　鎮咳効果

dℓ－カンフル，ℓ－メントール，ユーカリ油，テレビン油，ニクズク油，ウイキョウ油の経皮投与による効果をFig 2 に示した。6成分ともほぼdose に依存した鎮咳効果が認められた。ℓ－メントール，ユーカリ油およびウイキョウ油はおのおののmedian dose すなわち3％，2％および0.5％がhigh dose と同等かそれよりも強い鎮咳作用を示した。他の成分はhigh dose にて明らかな作用が認められた。これらの結果は咳の有無をall or non response あるいは咳の止まった回数のgraded response として評価した場合でも結果はほぼ同じであった。

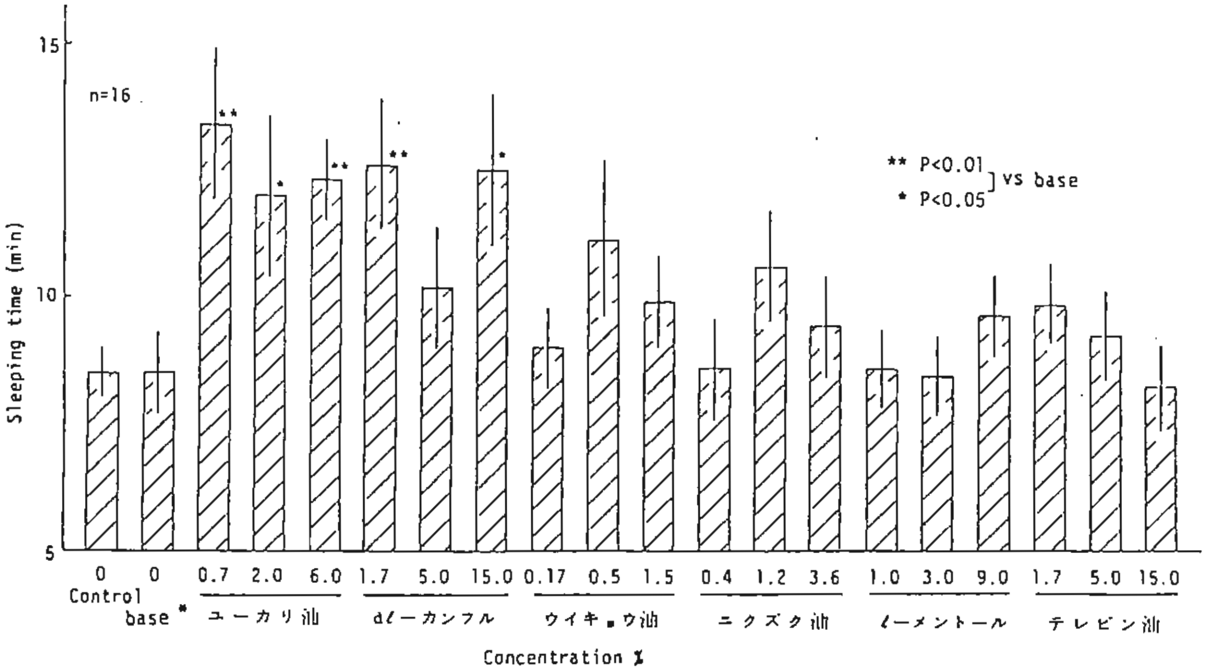


適用量：750 ㎎／㎏を剃毛胸部に塗擦した

Fig 2　モルモットの器械的刺激法によるせきに対する各種成分の濃度と鎮咳効果の関係

2)　鎮静効果

6成分の効果をFig 3 に示した。ユーカリ油，dℓ－カンフルには明らかな鎮静作用を認めたが，他の成分については弱い作用しか認められず，またいずれの成分についても明確なdose 依存性は認められなかった。



適用量：２０mgを剃毛腹部に塗擦した

＊ｂａｓｅ：ＩＫＤ−５９１０ ｂａｓｅ

Fig 3　マウスのチオペンタール睡眠延長作用試験における各種成分の濃度と鎮静効果の関係

2. ＩＫＤ－5910 の処方検討

1) 配合濃度の決定

鎮咳試験の結果からℓ－メントールは３％，ユーカリ油は２％，ウイキョウ油は0.5%を，鎮静試験の結果からニクズク油は1.2%を至適配合濃度とした。dℓ－カンフルについては特異な芳香および局所刺激作用を有することから，あまり濃度を上げるとその芳香は不快となり刺激性の点からみて問題が生じてくる。これらのことと鎮咳，鎮静試験の結果を考慮しdℓ－カンフルは５％を，テレビン油では鎮咳試験の結果と鎮静試験の結果などから総合的に判断して，中間濃度の５％をそれぞれ至適配合濃度と判断した。

2) 配合剤の決定

配合剤は単剤に比し，より優れた薬効を示す必要がある。Table 2 に示したようにdℓ－カンフル，ℓ－メントール，ユーカリ油およびテレビン油を配合したものを基本処方Ａとし，その基本処方にニクズク油を加えたものをＢとし，さらにウイキョウ油を加えたものをＣとし，各処方の薬効比較を鎮咳試験と鎮静試験にて行った。

Table 2　ＩＫＤ－5910 候補処方とその組成

有効成分	軟膏100g中の含有量(g)		
	A	B	C
dℓ－カンフル	5.0	5.0	5.0
ℓ－メントール	3.0	3.0	3.0
ユーカリ油	2.0	2.0	2.0
テレビン油	5.0	5.0	5.0
ニクズク油		1.2	1.2
ウイキョウ油			0.5

Ａ，ＢおよびＣ処方配合軟膏の経皮投与による鎮咳試験の結果をTable 3 に示した。Ａ処方では８匹中４匹に鎮咳効果が認められたが，Ｂ処方およびＣ処方ではともに８匹中７匹に鎮咳効果が認められた。鎮咳効果の発現時間，持続時間および咳の止まった回数をみた場合，Ｂ処方よりもＣ処方の方が優れていた。

Table 3　モルモットの器械的刺激法における各処方の鎮咳効果の比較

検　体	塗擦量（mg／kg）	有効／使用 匹数／匹数	検体適用後の有効匹数 15分	30分	60分	90分	120分	鎮咳／総発咳 回数／刺激回数
A	750	4/8	0	1	1	2	2	6/40
B	750	7/8	0	3	5	6	4	18/40
C	750	7/8	1	6	6	7	6	26/40

次に鎮静試験の結果をFig 4に示した。A処方では作用は認められなかったが，B，C処方では明らかな鎮静作用の増大が認められた。

以上の鎮咳試験と鎮静試験の結果から判断し，ＩＫＤ－5910 の処方はTable 2に示したC処方とした。

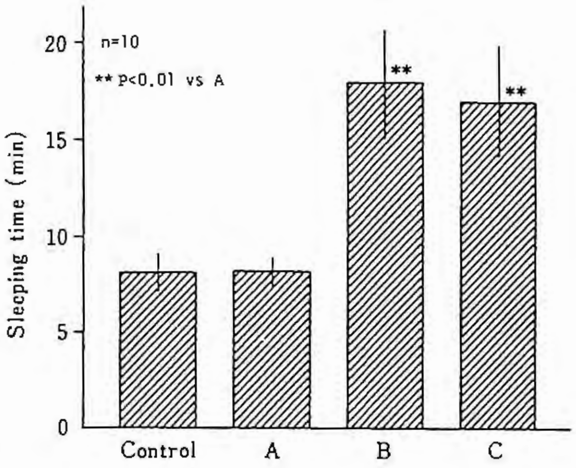


Fig4　マウスのチオペンタール睡眠延長作用試験における各処方の鎮静効果の比較

3.　ＩＫＤ－5910 の薬効薬理試験

1)　鎮咳効果

Table 4に結果を示した。ＩＫＤ－5910 基剤では全く鎮咳効果は認められなかったが，ＩＫＤ－ 5910 では8匹中7匹に鎮咳効果を認めた。また総発咳刺激回数中における鎮咳回数としてみた場合は40回中21回に鎮咳効果を認めた。また，市販品(V)でもほぼ同等の効果を認めたが，ややＩＫＤ－5910 よりも弱かった。一方，陽性対照薬 dihydrocodeine phospase 10 mg／kg（i. p.）ではＩＫＤ－ 5910 と同等の有効率であったが，総発咳刺激回数中における鎮咳回数はＩＫＤ－ 5910 よりも強い作用が認められた。

Table 4　モルモットの器械的刺激法におけるＩＫＤ－5910 及び関連薬剤の鎮咳効果

検　体	塗擦量（mg／kg）	有効／使用 匹数／匹数	検体適用後の有効匹数 15分	30分	60分	90分	120分	鎮咳／総発咳 回数／刺激回数
IKD-5910 base	750	0/8	0	0	0	0	0	0/40
IKD-5910	750	7/8	0	3	5	6	7	21/40
市販品（V）	750	6/8	0	3	3	6	6	18/40
Dihydrocodeine·H_3PO_4	(10mg/kg)*	7/8	2	5	7	7	7	28/40

* i.p.injection

2)　去痰効果

Table 5に結果を示した。ＩＫＤ－5910 基剤では9.2%の弱い分泌抑制作用が認められたが，ＩＫＤ－5910 では14.4%の明らかな分泌抑制作用が認められた（ $P < 0.05$ ）。また，市販品(V)でも効果が認められたが弱いものであった。一方，陽性対照薬 *dl*－isoproterenol hydrochloride　2 mg／kg（s.c.）では33.9%の明らかな分泌増大作用が認められた（ $P < 0.01$ ）。

Table 5　ラットの気道内色素排泄量を指標としたＩＫＤ－5910 及び関連薬剤の去痰効果

検　　体	動物数	塗擦量 (mg/site)	色素量 (μg/ml)	変化率(%) 増加	抑制
Control	7		0.812±0.04		
IKD-5910 base	7	750	0.737±0.05		9.2
IKD-5910	7	750	0.695±0.04*		14.4
市販品（V）	7	750	0.724±0.04		10.8
Isoproterenol·HCl	7	(2mg/kg,s.c.)	1.087±0.04**	33.9	

＊P<0.05　＊＊P<0.01　vs control

3)　解熱効果

Fig 5 に結果を示した。ＩＫＤ－5910 基剤，ＩＫＤ－5910 及び市販品(V)にはともに解熱作用は全く認められなかった。一方，陽性対照薬の indomethacine　8 mg／kg（p.o.）では解熱作用が認められた。

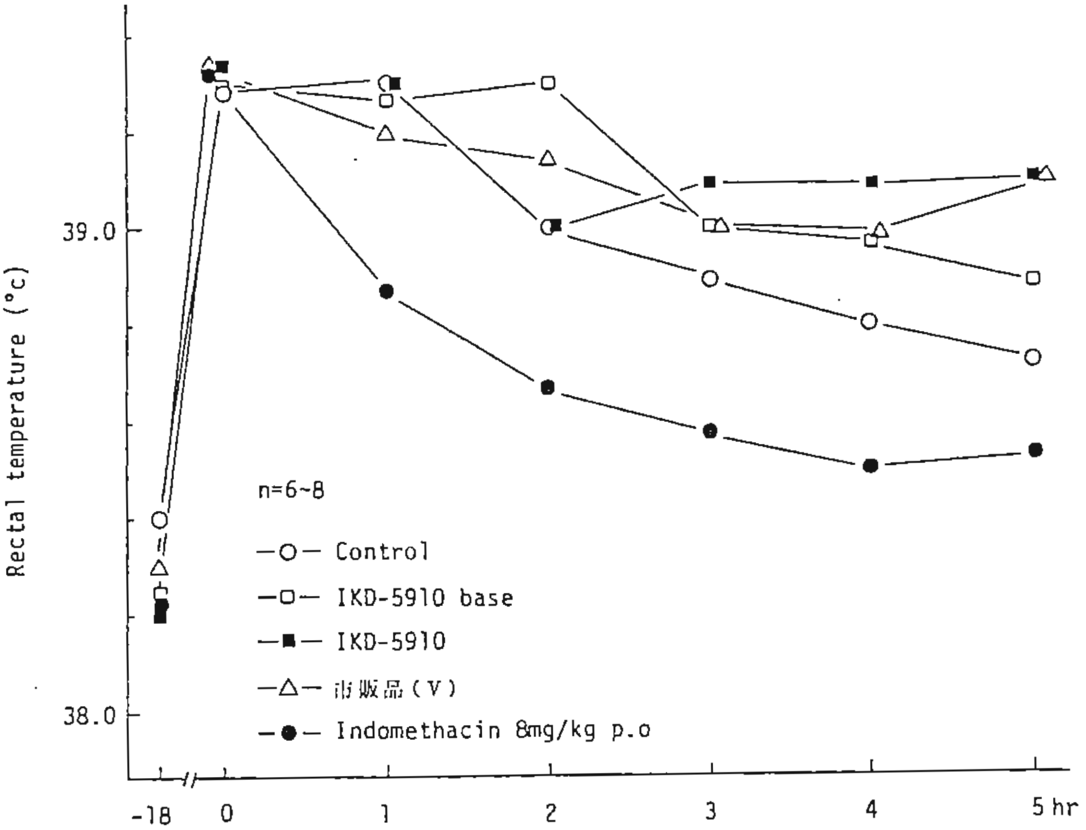


Fig 5　Yeast 発熱ラットにおけるＩＫＤ－5910 及び関連薬剤の解熱効果

4)　鎮痛効果

Table 6 に結果を示した。ＩＫＤ－5910 基剤では11.9％の弱い writhing 抑制作用が認められたが，ＩＫＤ－5910 では25.7％の明らかな抑制作用を認めた（Ｐ＜0.05）。また，市販品(V)では16.7％の弱い効果が認められた。一方，陽性対照薬 Inteban cream では44.7％と強い抑制作用が認められた（Ｐ＜0.01）。

Table 6　マウス酢酸writhing法によるＩＫＤ－5910及び関連薬剤の鎮痛効果

検　体	動物数	塗擦量 (mg／site)	writhing回数	抑制率 (%)
Control	12		41.2±2.6	
IKD-5910 base	12	50	36.3±2.3	11.9
IKD-5910	12	50	30.6±2.9*	25.7
市販品（Ｖ）	12	50	34.3±2.2	16.7
Inteban cream	12	50	22.8±2.7**	44.7

*P<0.05　** P<0.01 vs control

5)　抗炎症効果

Table 7に結果を示した。ＩＫＤ－5910基剤では10.7%の弱い抑制作用が認められたが，ＩＫＤ－5910では23.8%の明らかな抑制作用を認めた（Ｐ＜0.05）。なお，市販品(Ｖ)では5.9%と抑制作用は認められなかった。一方，陽性対照薬 Inteban cream では65.8%の顕著な抑制作用が認められた（Ｐ＜0.01）。

Table 7　ラットカラゲニン胸膜炎法におけるＩＫＤ－5910及び関連薬剤の抗炎症効果

検　体	動物数	塗擦量 (mg／site)	胸水量 (ml)	抑制率 (%)
Control	11		1.12±0.09	
IKD-5910 base	11	100	1.00±0.06	10.7
IKD-5910	10	100	0.85±0.06*	23.8
市販品（Ｖ）	10	100	1.05±0.10	5.9
Inteban cream	8	100	0.38±0.07**	65.8

*P<0.05　** P<0.01 vs control

6)　鎮静効果

Fig 6に結果を示した。ＩＫＤ－5910基剤では全く効果は認められなかったが，ＩＫＤ－5910では明らかな睡眠時間の延長作用が認められた（Ｐ＜0.05）。また，市販品(Ｖ)でもＩＫＤ－5910とほぼ同等の効果が認められた。一方，陽性対照薬 diphenhydramine hydrochloride 30mg/kgでは顕著な睡眠延長作用が認められた（Ｐ＜0.01）。

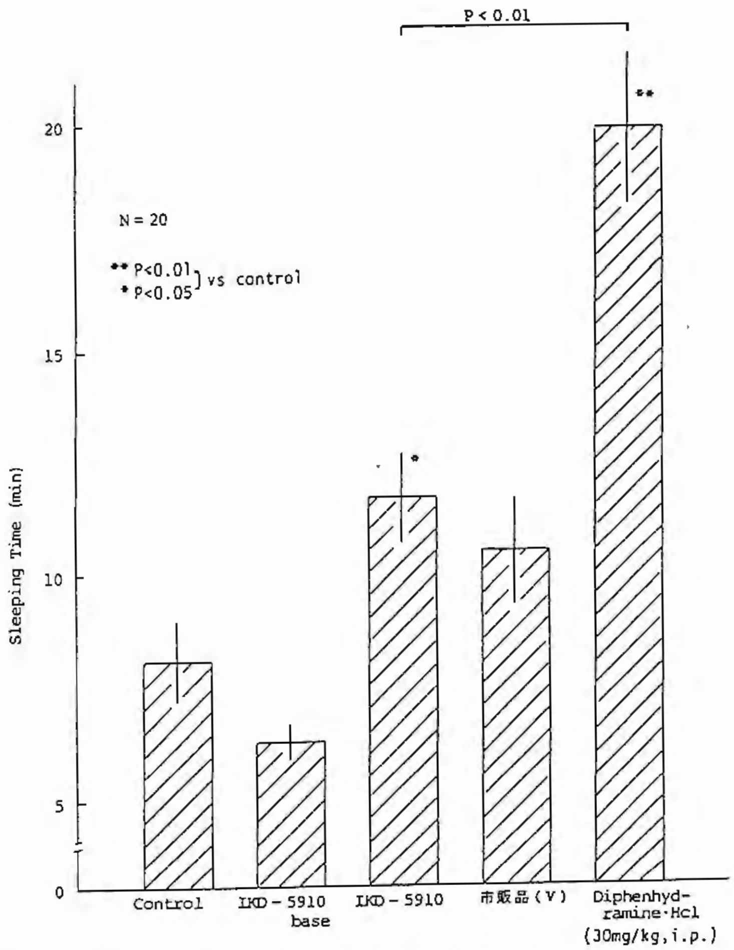


Fig 6　マウスのチオペンタール睡眠延長作用試験における
ＩＫＤ－5910 及び関連薬剤の鎮静効果

7)　呼吸運動効果

Fig 7 に結果を示した。ＩＫＤ－５９１０ の場合，適用60分後において，市販品(V)は30，45及び60分後に有意な呼吸数の減少作用が認められた（ P＜ 0.05)。呼吸換気量に関してはＩＫＤ－５９１０ 基剤とＩＫＤ－５９１０ はほとんど影響が認められなかったが，市販品(V)では30分以降減少作用が認められた（ P＜ 0.05 ）。

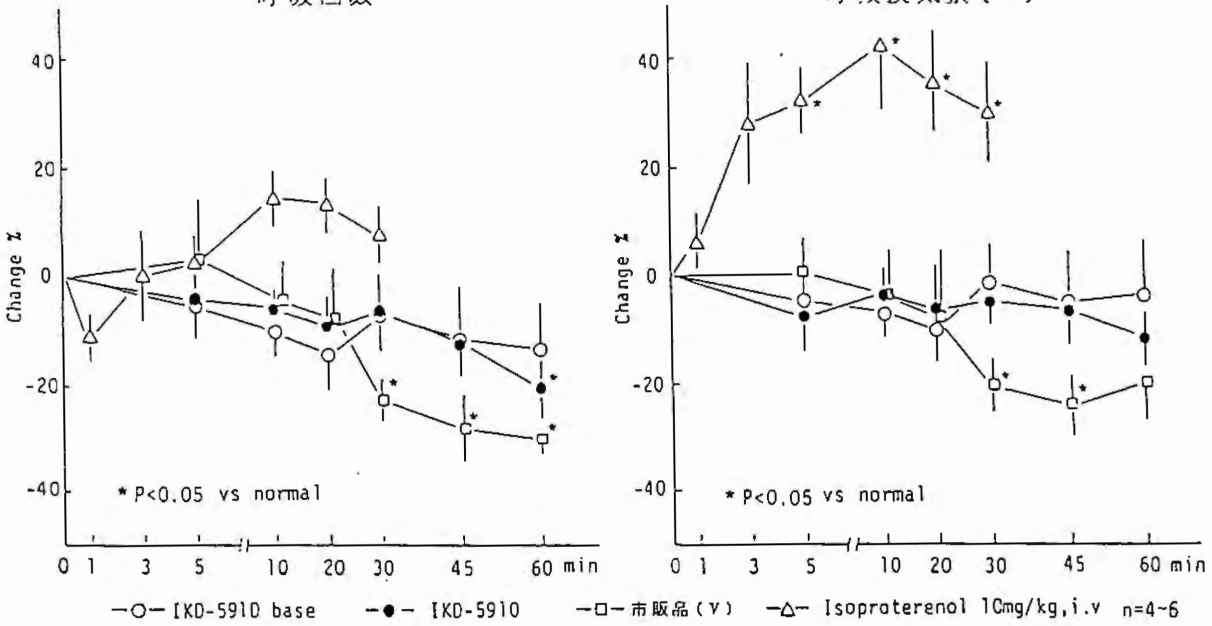


Fig 7　モルモットの自発呼吸運動に対するＩＫＤ－5910 及び関連薬剤の効果

4. 吸入によるIKD－5910の鎮咳効果

Table 8に結果を示した。IKD－5910の場合750㎎／㎏に相当する量から揮散する芳香成分を吸入させた場合は6匹中1匹に効果が認められ，1,500㎎／㎏に相当する量からの場合は6匹中2匹に効果が認められた。一方，市販品(V)の場合750㎎／㎏相当量からでは効果は認められなかった。1,500㎎／㎏相当量からの場合はIKD－5910同様，6匹中2匹に効果が認められたが，総発咳刺激回数中における鎮咳回数は30回中の2回とIKD－5910よりも弱いものであった。

Table 8　モルモットの器械的刺激法におけるIKD－5910と市販品(V)の蒸気吸入による鎮咳効果

検体	塗擦量 (㎎／㎏)	有効匹数／使用匹数	検体適用後の有効匹数 15分	30分	60分	90分	120分	鎮咳回数／総発咳刺激回数
IKD-5910	750	1/6	0	0	0	1	1	2/30
IKD-5910	1500	2/6	0	0	0	2	2	4/30
市販品(V)	750	0/6	0	0	0	0	0	0/30
市販品(V)	1500	2/6	0	0	0	0	2	2/30

Ⅱ 毒性試験の部

1. 経皮急性毒性試験

Table 9に結果を示した。IKD－5910およびIKD－5910基剤は16g／㎏の適用によっても，ラット，モルモットとも全く死亡例は認められなかった。一般症状ではラット，モルモットの雌雄とも適用日にやや興奮状態を示したが，その後特記すべき変化は全く認められなかった。また，IKD－5910基剤，IKD－5910の体重変化はラットでは雌雄ともcontrolと変らなかった。しかしながら，モルモットではintactと比較するとcontrol，IKD－5910基剤およびIKD－5910は雌雄とも体重増加の抑制傾向が認められたが，controlとの比較ではIKD－5910基剤，IKD－5910とも差は認められなかった。

14日後，全生存例を剖検したところ，皮膚およびその他の臓器並びに組織にはIKD－5910に起因する所見は全く認められなかった。

Table 9　IKD－5910の経皮急性毒性試験

動物	性	被検体	用量 (g/kg)	死亡率	LD_{50} (g/kg)	体重増加 (g)
ラット	♂	Control	0	0/5		49.2±2.0
		IKD-5910 base	16	0/5	＞16	51.0±2.7
		IKD-5910	16	0/5	＞16	49.2±2.9
	♀	Control	0	0/5		20.4±1.0
		IKD-5910 base	16	0/5	＞16	21.4±0.9
		IKD-5910	16	0/5	＞16	22.2±2.1
モルモット	♂	Intact	0	0/5		127.6±6.3
		Control	0	0/5		103.8±6.4
		IKD-5910 base	16	0/5	＞16	110.8±9.7
		IKD-5910	16	0/5	＞16	108.4±8.7
	♀	Intact	0	0/5		97.8±8.7
		Control	0	0/5		66.8±10.9
		IKD-5910 base	16	0/5	＞16	56.4±7.4
		IKD-5910	16	0/5	＞16	51.4±5.2

2. 皮膚一次刺激性試験

Table 10 に結果を示した。ＩＫＤ－5910 はＩＫＤ－5910 基剤および日局親水軟膏と同様0.5前後のごく軽度の刺激性が全観察期間中認められた。なお，症状としてはいずれの場合も軽度の紅斑のみであった。また，性差は特に認められなかった。

Table 10　モルモットにおけるＩＫＤ－5910 の皮膚一次刺激性試験

被検体	平均スコア											
	1hr		3hr		5hr		24hr		48hr		72hr	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
IKD-5910 base	0.5	0.4	0.6	0.5	0.1	0.2	0.7	0.4	0.7	0.3	0.5	0.5
IKD-5910	0.4	0.3	0.1	0.5	0.2	0.5	0.6	0.3	0.5	0.4	0.4	0.4
Hydrophilic ointment	0.4	0.3	0.4	0.6	0.2	0.4	0.3	0.6	0.9	0.3	0.7	0.5

3. 累積皮膚刺激性試験

Fig 8 に結果を示した。ＩＫＤ－5910 とＩＫＤ－5910 基剤は試験開始5日目迄刺激性は少しずつ増大したが，その時点の平均スコアは1.9 および 2.0 と軽度なものであった。その後21日目迄はぼ一定であったが22日目より軽快傾向を示した。一方，日局親水軟膏の場合は3日目まで刺激性は直線的に増大し，その時点のスコアは2.7と中等度なものであった。その後，若干の軽快と増悪をくり返しながなも全体として軽快傾向を示した。なお，症状としてはいずれの場合も大部分が紅斑であったが，浮腫を伴う例も時々認められた。

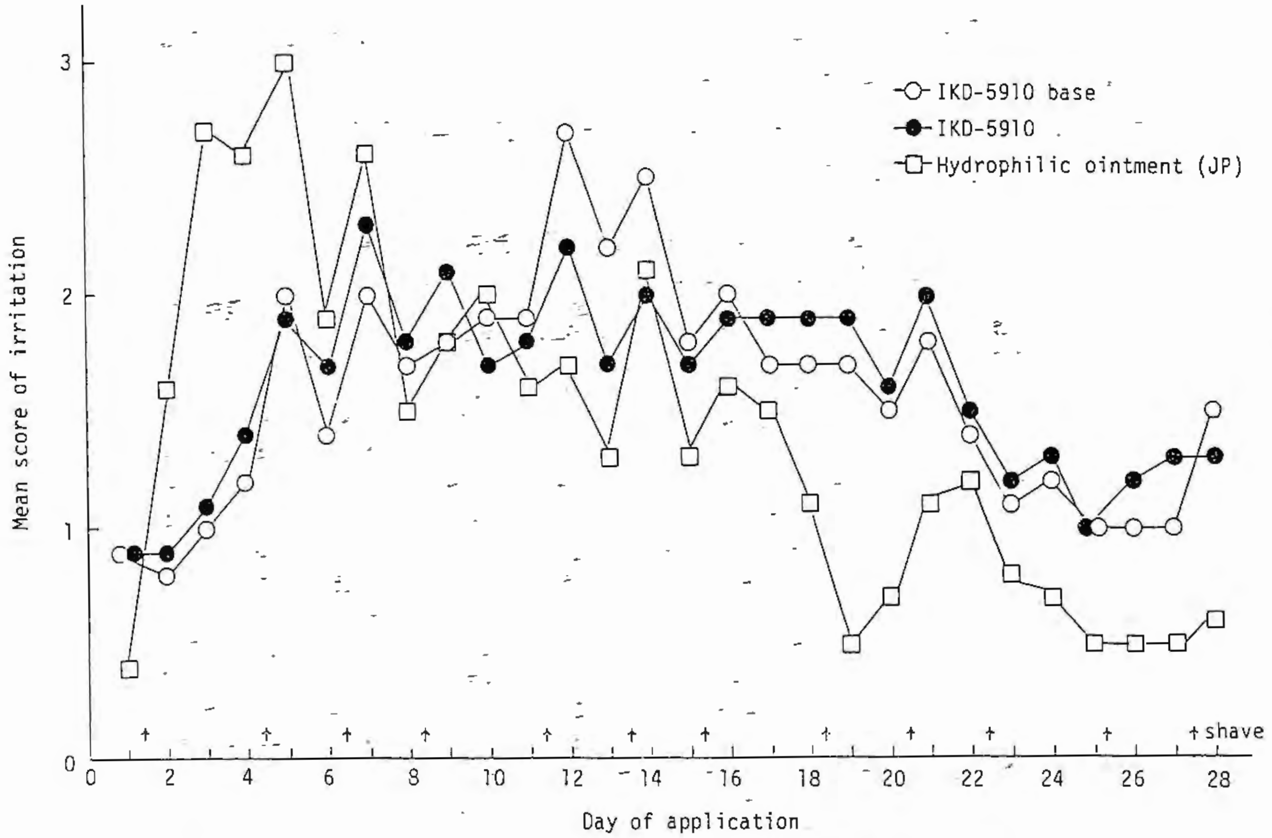


Fig 8　モルモットにおけるＩＫＤ－5910 の累積皮膚刺激性試験

4. 皮膚感作性試験

Table 11に結果を示した。IKD－5910 基剤の誘発24，48および72時間後の感作群と非感作群の平均スコアに差は認められず，また，皮膚症状はいずれの場合も弱い紅斑のみであり，浮腫は全く伴わなかった。

一方，陽性対照薬のDNCBでは感作群の反応が明らかに強く，各時間帯とも非感作群に比べ平均スコアで顕著な差が認められた（P＜0.01）。なお，DNCB適用部の皮膚症状としては感作群の場合，全例に浮腫を伴った強い紅斑が認められたが，非感作群では弱い紅斑のみであり浮腫は全く伴わなかった。

Table 11　モルモットにおけるIKD－5910の皮膚感作性および光毒性試験

試験方法	被検体	条件	平均評点 24hr	平均評点 48hr	平均評点 72hr	判定
皮膚感作性	IKD-5910 base	感作群	0.20	0.30	0.30	(−)
		非感作群	0.20	0.40	0.40	
	IKD-5910	感作群	0.60	0.90	1.00	(−)
		非感作群	0.20	0.40	0.50	
	1% DNCB	感作群	4.60	4.40	5.40	(+)
		非感作群	1.00	0.90	0.50	
光毒性	IKD-5910 base	照射部	0	0.30	0	(−)
		非照射部	0	0.30	0	
	IKD-5910	照射部	0.10	0	0	(−)
		非照射部	0.10	0	0.10	
	2% 8-MOP	照射部	5.10	4.70	4.30	(+)
		非照射部	0	0	0	

5. 光毒性試験

Table 11 に結果を示した。IKD－5910 およびIKD－5910 基剤ではUV照射部と非照射部において差は認められなかった。一方，陽性対照薬の8－MOPはUV照射部においてのみ，全例に浮腫を伴った強い紅斑が認められたが，非照射部では何らの反応も認められなかった（P＜0.01）。

6. 眼粘膜刺激性試験

Table 12 に結果を示した。IKD－5910 およびIKD－5910 基剤の刺激性は6％酢酸に比べ一過性のものであった。障害部位の大部分は結膜ないし虹彩に対する軽度の充血であったが，6％酢酸のみが点眼1日後に角膜に対する一過性のごく弱い混濁が認められた。なお，6％酢酸も含めIKD－5910，IKD－5910 基剤いずれも洗浄群と非洗浄群間に刺激性の差はほとんど認められなかった。

Table 12　ウサギにおけるIKD－5910の眼粘膜刺激性試験

被検体	条件	平均スコア 1hr	3hr	5hr	1day	2day	3day	5day	7day
IKD-5910 base	洗浄群	0	0.7	0	0	0	0	0	0
	非洗浄群	1.3	0.7	0	0	0	0	0	0
IKD-5910	洗浄群	3.7	2.0	0.7	2.4	0.7	0	0	0
	非洗浄群	2.0	0	0	0	0	0	0	0
6% Acetic Acid	洗浄群	12.4	9.3	10.7	10.7	6.7	4.0	0.7	0
	非洗浄群	8.0	8.0	8.7	6.7	7.3	4.7	0.7	0

考　　察

かぜ症候群は日常的に羅患率の高い疾患であって，症状に合せた各種対症療法剤の服用が行われている。近年，内服薬も安全性重視の方向にあるが，アスピリンなどのサリチル酸系解熱鎮痛薬による小児ライ症候群の発生,[8] 非ステロイド性抗炎症剤の胎仔動脈管収縮の問題[9]等が指摘されている。そのようなわけで，全身性の副作用のない安全性の高い経皮吸収型製剤，ぬるかぜ薬ＩＫＤ－5910の開発を試みた。しかしながら，かぜの諸症状を想定した外用剤による薬効薬理学的研究はほとんど行われていないのが現状である。そこで著者らは，ＩＫＤ－5910の処方設計において薬効薬理学的に評価しつつ薬物の選択を行った。

ＩＫＤ－5910の配合成分として*dℓ*－カンフル等を始めとして揮散性の高い芳香性生薬成分を選んだのは，これら成分が経験的に鎮痛，抗炎症作用を目的とした外用剤に繁用されているという事実と，かぜの諸症状の緩和に関連すると思われる薬理作用を有しているためである。すなわち，*dℓ*－カンフルでは局所投与による鎮痛・止痒作用[10,11]および抗炎症作用[12]，全身投与による去痰作用[11]，*ℓ*－メントールでは局所投与による鎮痛・抗炎症作用[12,13]，鼻腔，咽頭，喉頭などのカタルならびに腫脹時の粘膜麻痺除去作用[13]，ユーカリ油では全身投与による去痰作用[14,15]，テレビン油では全身投与による去痰作用[14,15]および抗炎症作用[16]，ニクズク油[17]では吸入にて，ウイキョウ油[14]は全身投与にてそれぞれ去痰作用等が報告されている。さらにこれら成分は経皮吸収のみならず揮散性を有していることから，体温によって温められ揮散した成分が吸入され気道系への直接効果も期待できるためである。

ＩＫＤ－5910の処方検討のため，モルモットによる鎮咳試験とマウスによる鎮静試験にて効果の有無と配合濃度の検討を行った。鎮咳効果では*ℓ*－メントール，ユーカリ油及びウイキョウ油に強い効果を認め，*dℓ*－カンフル，テレビン油，ニクズク油では濃度を上げることにより明らかな効果を認めた。一方，鎮静効果においてはユーカリ油と*dℓ*－カンフルに明らかな効果を，ウイキョウ油とニクズク油には弱いながらもその傾向を認めた。それら結果をもとに各成分の配合濃度は，*ℓ*－メントール，ユーカリ油，ニクズク油およびウイキョウ油では，それぞれ３％，２％，1.2％および0.5％とし，*dℓ*－カンフルでは本文の結果と薬効再評価結果[18]を参考にし５％，同じくテレビン油は本文の結果と使用前例等から５％と決定した。

ＩＫＤ－5910の処方決定についてはTable 2に示したように，*dℓ*－カンフル，*ℓ*－メントール，ユーカリ油，テレビン油を基本処方Ａとし，それにニクズク油を加えたものＢ，さらにウイキョウ油を加えたものＣについての効果を鎮咳試験と鎮静試験で比較検討した。Table 3およびFig 4に示したように，鎮咳効果では６剤配合のＣ処方が最も有効性が高かったが，鎮静効果では５剤配合のＢ処方よりも６剤配合のＣ処方の方がやや緩和な効果が得られた。これらの結果よりＩＫＤ－5910の処方はＣすなわち，*dℓ*－カンフル５％，*ℓ*－メントール３％，ユーカリ油２％，テレビン油５％，ニクズク油1.2％，ウイキョウ油0.5％の６剤配合とした。

ＩＫＤ－5910はかぜの諸症状を想定してモルモットでの器械的刺激法による鎮咳試験，ラットでの気道分泌法による去痰試験，ラットでのイースト発熱法による解熱試験，マウスでの酢酸writhing法による鎮痛試験，ラットでのカラゲニン胸膜炎法による抗炎症試験，マウスでのチオペンタール睡眠延長作用による鎮静試験およびモルモットでの呼吸運動について検討したところ，いずれの試験においてもほぼ明らかな効果を認め，対照として用いた市販品(Ｖ)よりも優れた効果が認められた。なお，ＩＫＤ－5910には明らかな鎮痛・抗炎症作用が認められたにもかかわらず，解熱作用は認められなかった。久木[19]は非ステロイド軟膏の抗炎症効果は，適用時期，塗布回数等の用法用量的要因によって大きな影響を受けたと報告しているので，解熱効果についてはこの面からの検討が必要と考え

られる。

外用剤による効果は局所からの経皮吸収による topical effect[20]と systemic effect[21]を示すものがあり，さらに semi－topical effectの概念が提唱されている[22]。ＩＫＤ－5910 の場合，配合成分はいずれも特異な芳香を有し極めて揮散性の高い製剤であることから，胸部等に塗擦した時，経皮吸収される部分と皮膚から揮散した成分が吸気中に吸入される部分がある。特に後者については吸入のみによる鎮咳効果を調べたところ，Table 8 に示したように弱いながらも明らかな鎮咳効果が認められた。したがって，ＩＫＤ－5910 の各種薬効薬理試験の効果は塗擦局所からの経皮吸収に基づく効果と，体温により温められた芳香性成分の呼吸器系への吸入効果が，相加的あるいは相乗的に作用し有効性を示しているものと考えられる。

次にＩＫＤ－5910 の毒性試験についてであるが，まず経皮急性毒性試験における外用剤の適用面積についてであるが，ＯＥＣＤ基準では総体表面積の10％を提唱している[23]。著者らはラット，モルモットともさらにその 2 倍の面積を適用面積とした。ＩＫＤ－5910 は最大塗擦量として16 g/kg適用したが，全く死亡例を認めず，また病理組織学的にもＩＫＤ－5910 に起因すると考えられる所見は全く認められなかった。皮膚一次刺激性，累積皮膚刺激性もともに日局親水軟膏とほぼ同等であった。皮膚感作性，光毒性もともに陰性の結果を得た。さらに眼粘膜刺激性も 6 ％酢酸に比べると明らかに弱く一過性であり，Kay and Calandra の基準による刺激の等級付けでもほぼ practically nonirritating と判定される。これらのことよりＩＫＤ－5910 は経皮急性毒性，皮膚刺激性，皮膚感作性，光毒性及び眼粘膜刺激性等において危惧すべき毒性はほとんど認められず，安全性の高いものと考えられる。

以上のように，ＩＫＤ－5910 は外用することにより鎮咳効果，去痰効果，鎮痛効果，抗炎症効果および鎮静効果等を示したこと，さらに安全性の高いこと等より，ぬるかぜ薬としてかぜの諸症状すなわち，せき，たん，鼻水，鼻づまり，くしゃみ，のどの痛み，頭痛，関節の痛み，筋肉の痛み等に対し臨床的にも明らかな効果が期待されるものと考えられる。

文　献

1) 高木敬次郎ほか：薬誌，**80**，1497（1960）

2) 江田昭英ほか：日薬理誌，**74**，317（1978）

3) 石河醇一ほか：薬理と治療，**13**，717（1985）

4) Katori M. et al. : Agents and Actions , **8** , 108（1978）

5) Draize J. H. et al. : J. P. E. T., **82**, 377（1944）

6) 佐藤悦久ほか: 皮膚，23， 461（1981）

7) Kay J. H. et al. : J. Soc. Cosmet. Chemists ,**13**, 281（1962）

8) 関　亨　：医薬ジャーナル，**21**，1067（1985）

9) Kazuo M. et al. : Prostaglandins, **28**, 527（1984）

10) 日本公定書協会編：第10改正日本薬局方解説書，広川書店Ｄ－629（1981）

11) Swinyard E. A. : グッドマン・ギルマン薬理書〔下〕，広川書店　Ｐ1225（1978）

12) 鈴木良雄ほか：応用薬理，**19**，239（1980）

13) 日本公定書協会編：第10改正日本薬局方解説書，広川書店　D－887（1981）

14) Boyd　E. M. et al.　：J. Med. Sci.，**211**，602（1946）

15) 高木敬次郎ほか編集：薬物学，南山堂 P 236（1976）

16) Damas　J. et al.：Naunyn-Schemied. Arch. Pharmacol.，**327**，　143（1984）

17) Boyd E. M.：Arch. Otalaryng.，**92**，372（1970）

18) 厚生省薬務局監修：薬務公報第1202号（1982）

19) 久木浩平：日薬理誌，**79**，461　（1982）

20) 長谷川頼彦ほか：薬理と治療，**7**，15（1979）

21) 樋口亮一：製薬工場，**5**，　203（1985）

22) 永井恒司：Therapeutic Research，**3**　，1043（1985）

23) 大森義仁監修：OECD化学物質毒性試験指針，化学工業日報社，（1981）

家庭薬研究 No.6 51（1987）

〔原　著〕

Zymogen 活性化機構に及ぼすオウバク成分の影響(2)※

上　川　　浩
Hiroshi KAMIKAWA
株式会社廣貫堂　研究開発部※※

ミカン科落葉高木キハダ（Phellodendron amurense Ruprecht）の樹皮であるオウバクは，古くより胃腸薬や消炎薬として，内用または外用に多用されてきた重要な生薬の一つである。

前報[1)]において，このオウバク中のある成分が，消化性プロテアーゼの活性化機構に対して，試験管内で抑制的に作用することを見出し，その抑制成分の化学的性質や，作用機構について簡単に検討した結果について報告した。

今回，これに若干の検討を加え，また，これまで主として研究されてきたオウバクの主成分であるベルベリンとの比較を，アセチルコリンエステラーゼ活性に対する作用を指標として行った。

実験方法

1. オウバクエキスの調製

オウバクを約5倍量のメタノールで数回加熱抽出し，さらにソックスレー抽出器を用いてメタノールにほとんど色がつかなくなるまで抽出し，抽出液は合わせて溶媒を留去してメタノールエキスとした。また，この残渣について約5倍量のアセトニトリルと水の混液（1：1）で3回抽出し，抽出液は合わせて溶媒を留去し，このうち水に不溶の部分を除いたものを50％アセトニトリルエキスとした。

2. カラムクロマトグラフィー

DEAE－及びCM－セルロース（Whatman　DE－52，CM－52）カラム（4.4cm φ×40cm）を用いてそれぞれAcOH－AcONa 緩衝液（0.01M，pH5.0）及びTris－HCl 緩衝液（0.01M，pH8.0）でイオン交換クロマトグラフィーを，またToyopearl HW－50F（東洋曹達工業）を担体としてゲルろ過を行い，フラクションコレクターにて約10mlずつ分取した。

3. プロテアーゼ活性化測定法

前報と同様に，C3H／He系雄性マウスより膵臓及び小腸を摘出し，洗浄後それぞれ精製水を加え，ガラス製ホモジナイザーで20％（W／V）磨砕液を調製し，これを12,000×gで30分間遠心し，その上澄液を各臓器抽出液とした。[2)] ザイモーゲンつまり酵素前駆体として膵臓抽出液を，また活性化因子として小腸抽出液または精製トリプシン（Merck）を用い，これらを適当な濃度に希釈，混合し，さらにオウバク抽出液及びリン酸緩衝液（1／15M，pH 7.4）1mlを加え，計2mlとした。これを37℃で60分間インキュベーションしてプロテアーゼを活性化させた後，基質として1％カゼイン溶液（Hammarsten氏法カゼイン1gを1／15M Na_2HPO_4 75mlに加熱溶解した後，精製水で100mlとする。）1mlを加え，さらに30分間インキュベーションして蛋白を分解させ

※　第6回家庭薬開発研究会発表（富山，1986年11月7日）

※※ 〒930　富山市梅沢町2－9－1　　TEL　0764（24）2271

た後，0.8Mトリクロル酢酸1 mℓを加え，未分解の蛋白を沈殿させた。これを遠心，その上澄液を1 mℓとり，これに0.4M Na_2CO_3 5 mℓと1 Nフェノール試薬1 mℓを加えて呈色させ，その660 nmにおける吸光度をプロテアーゼ活性の指標とした。[3]

4. アセチルコリンエステラーゼ活性測定法

基質としてacetylthiocholine iodideを，発色試薬として5,5'−dithiobis−2−nitrobenzoic acid（DTNB）を用いたチオコリン法にて行った。[4]（Fig 1）

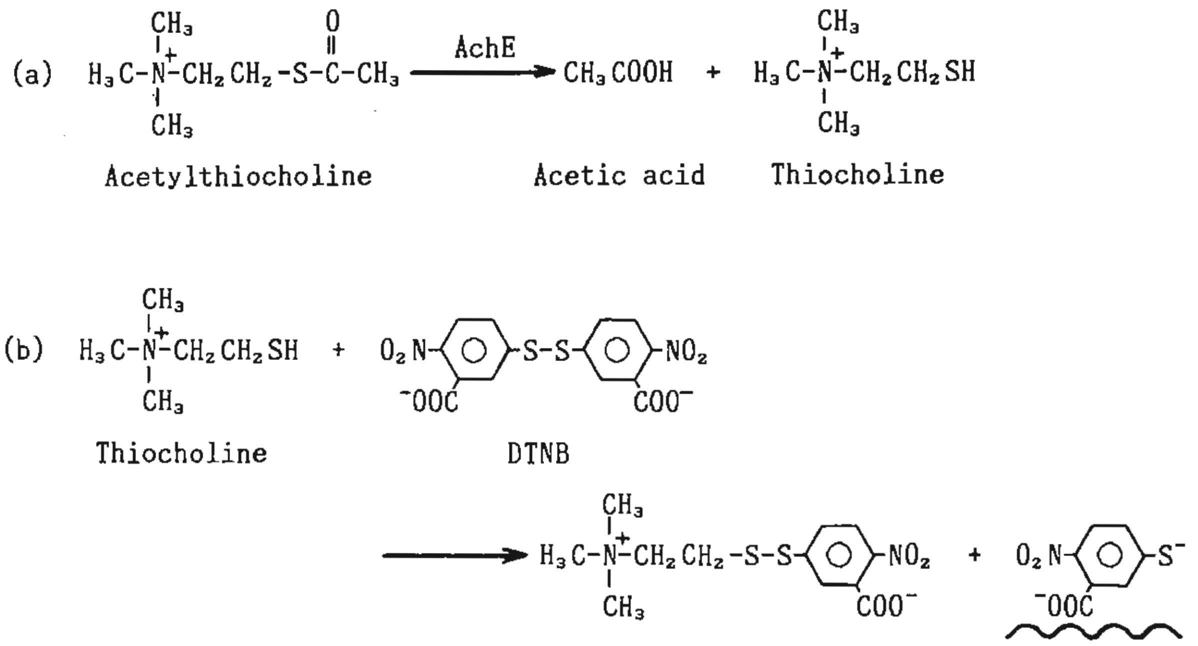


Fig 1 AchE 活性測定法の原理

過剰量のAch溶液及びDTNB溶液を各々1 mℓずつと，リン酸緩衝液（0.1M，pH 8.0）2 mℓを混合，ここにオウバク分画液1 mℓ及び適当な濃度のAchE溶液1 mℓを加え，25℃でインキュベーションした。この反応溶液の410 nmにおける吸光度を一定時間おきに測定し，単位時間あたりの吸光度の上昇をAchE活性とした。

実験結果

前報より大量の試料を用いて，やや条件を変えてイオン交換クロマトグラフィーを行い，その分画液の280 nmにおける吸光度と，プロテアーゼ活性化に対する抑制作用とを比較した。

陰イオン交換体であるDEAE−セルロースによる分画では，280 nmにおける吸光度を指標とした最初のピークに，プロテアーゼ活性化に対する抑制作用が認められた。（Fig 2）

続いて，この抑制作用を示すフラクションについて，陽イオン交換体であるCM−セルロースによる分画を行ったところ，やはり最初の，小さなピークに抑制作用が認められた。（Fig 3）

更にこのフラクションについてToyopearl HW−50F（蛋白排除限界 8×10^4）を担体としてゲルろ過を行ったところ，比較的早く流出するピークに抑制作用がみられた。（Fig 4）

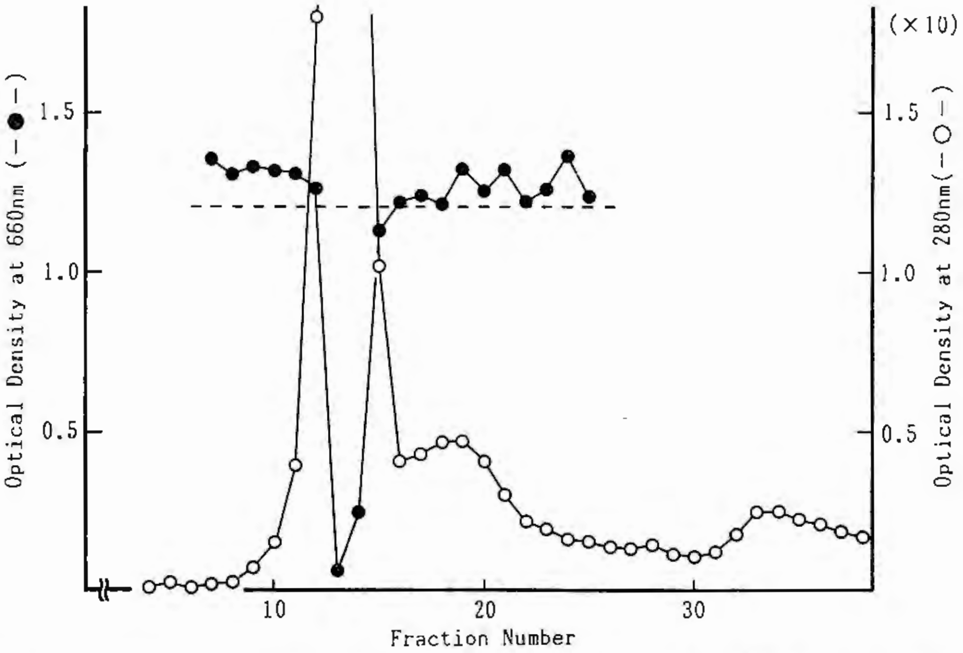


Fig 2　DEAE－セルロースによるオウバク成分のイオン交換クロマトグラム

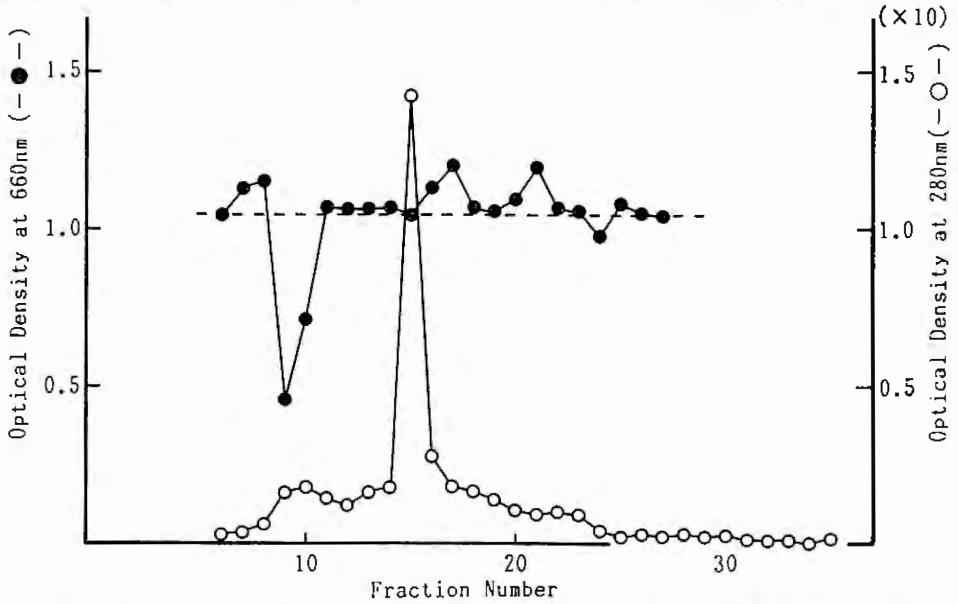


Fig 3　CM－セルロースによるオウバク成分のイオン交換クロマトグラム

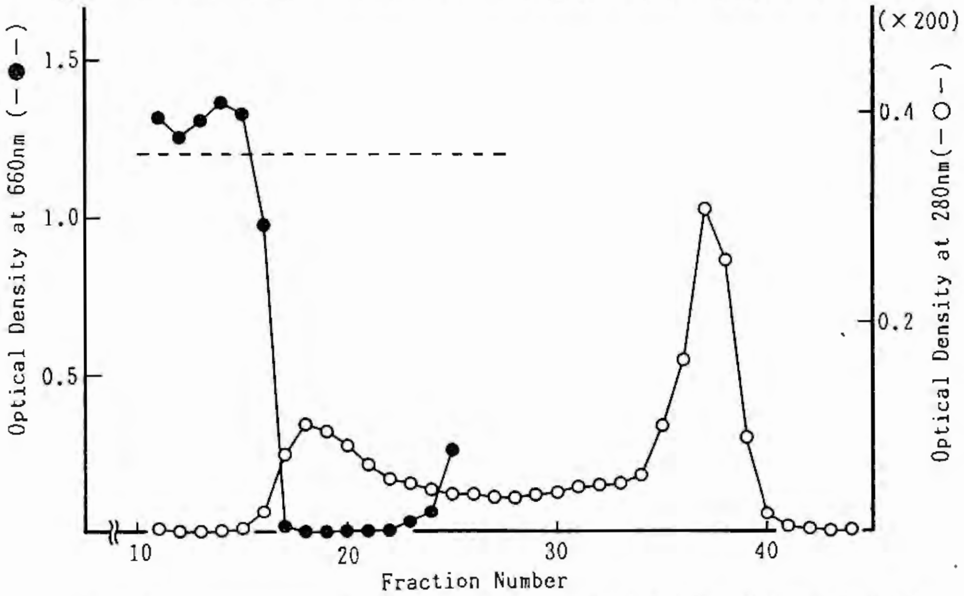


Fig 4　Toyopearl　HW－50F によるオウバク成分のゲルろ過

続いて，このイオン交換及びゲルろ過により精製された，プロテアーゼ活性化に対する抑制成分の，すでに活性をもった精製トリプシンに対する，直接的な作用を検討した。その結果，用量依存的にトリプシンのプロテアーゼ活性を阻害する作用が認められた。（Fig 5 ）

また，トリプシンとはタイプの異なるプロテアーゼであるパパインに対する作用についても検討したところ，その用量には差があるものの，やはり同様な活性阻害作用がみられた。（Fig 6 ）

また，この精製フラクションは，塩酸または水酸化ナトリウム溶液で，水浴上で30分間処理することにより，そのプロテアーゼ活性に対する抑制作用が不可逆的に失われた。（Fig 7 ）更に，このフラクションについて種々の定性試験を試みたところ，糖の定性試験であるMolish－Udransky 反応に陽性であり，シリカゲル薄層クロマトグラフィーで，展開溶媒としてn－BuOH・AcOH・10％NH_3・H_2O（5：3：1：1）混液を用いた場合，硫酸またはニンヒドリンにより検出される単一のスポットを示した。

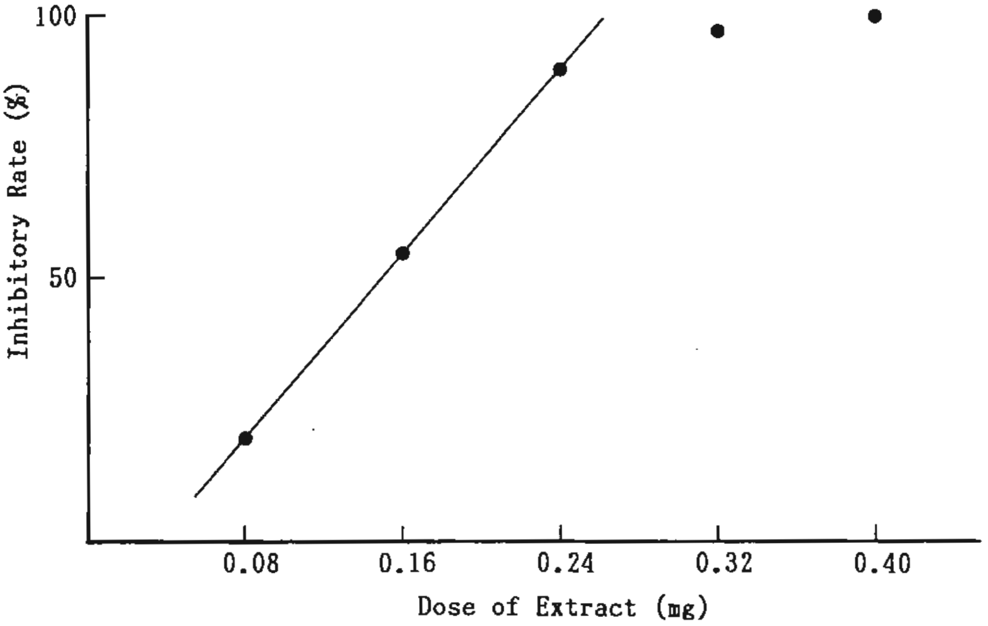


Fig 5　オウバク精製フラクションのトリプシンに対する作用

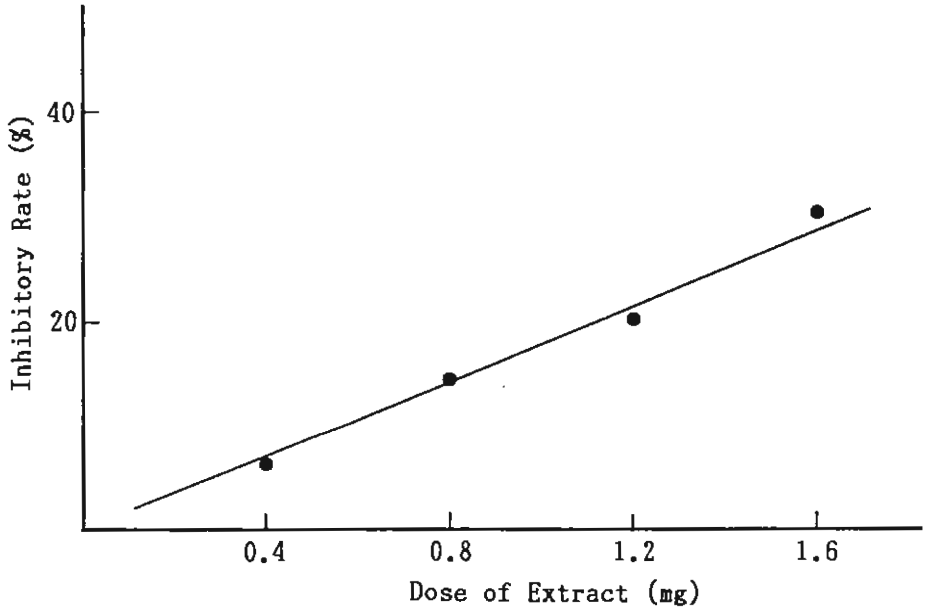


Fig 6　オウバク精製フラクションのパパインに対する作用

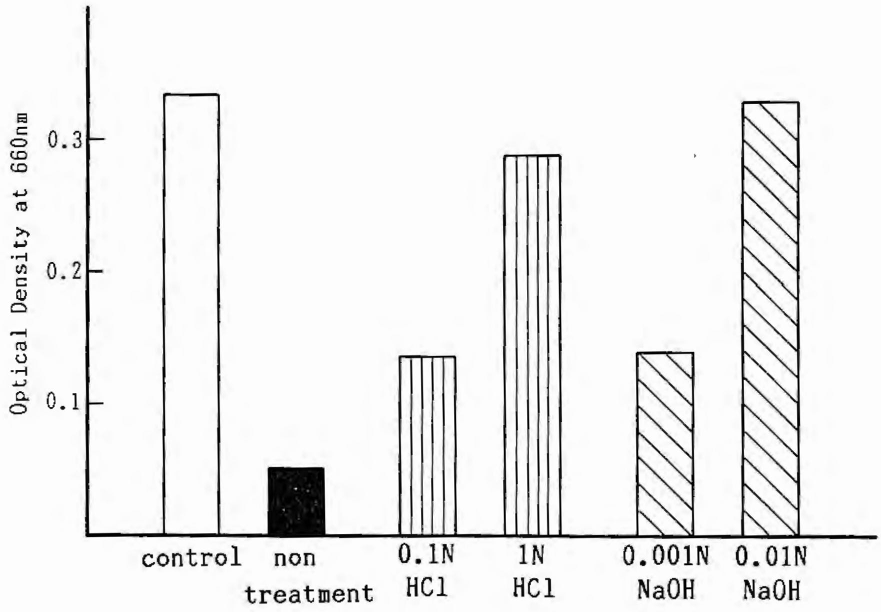


Fig 7　オウバク精製フラクションに対する酸またはアルカリの作用

ここで，ベルベリンにはアセチルコリンエステラーゼ（ AchE ）に対する活性阻害作用が報告されている。[5] そこで，ベルベリンとの比較のため，この分画成分のAchE活性に対する作用を検討した。その結果，オウバクのメタノールエキスと50%アセトニトリルエキスには，同程度のAchE活性阻害作用がみられた。しかし，DEAEーセルロースで精製することにより，その阻害作用はかなり弱いものとなり，CMーセルロースにより精製したフラクションには，すでにAchE活性に対する作用は認められなかった。（ Fig 8 ）

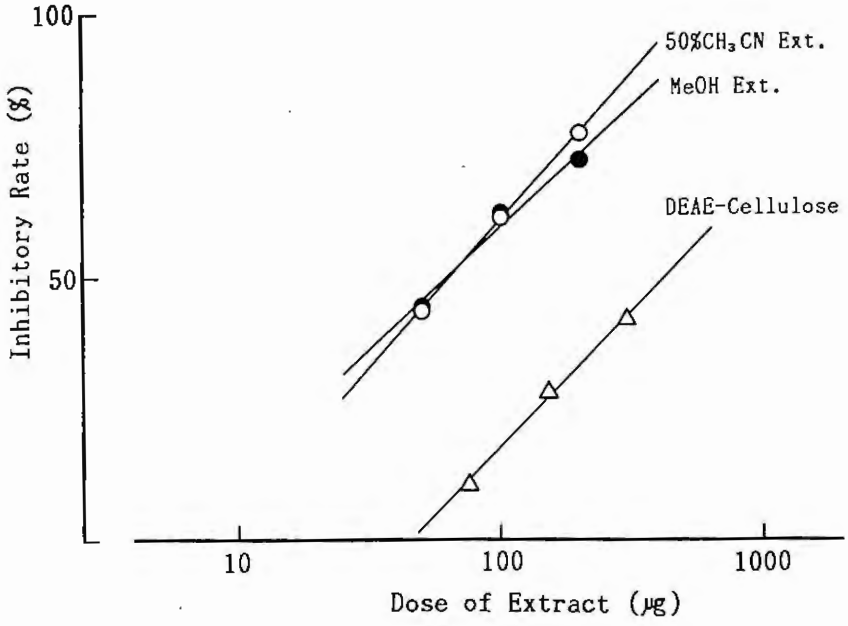


Fig 8　オウバク成分のAchE活性に対する作用

結論及び考察

このオウバク中のプロテアーゼ活性化機構に対する抑制成分は，前報どおり，熱安定性の高い水溶性かつ電気的に中性の物質であり，更に，その分子内に糖や，アミノ酸または蛋白を含む，分子量数万ないし十数万の高分子で，酸やアルカリに対して不安定な物質であると推測される。

そしてその作用機構は，この成分がプロテアーゼインヒビターであり，プロテアーゼの活性を非特異的に阻害することにより，一種の蛋白分解作用である活性化因子の作用をも抑制し，その効果を発現するのではないかと考えられる。

また，前報で報告したとおり，この成分とベルベリンとが，プロテアーゼ活性化機構に対しては相反する作用をもつことや，今回の結果より，ベルベリンのもつAchE活性に対する阻害作用が，この成分には認められないことなどから，この成分は，オウバクのもつ薬効のうち，これまで主として研究されてきたベルベリン系アルカロイドとは，また異なった薬効に関与している可能性が考えられる。

さらに，この成分が酸に対しては不安定なことから，オウバクを経口的に用いた場合と，外用剤として用いた場合の，それぞれの薬効の違いなどについても，今後検討していきたいと考えている。

謝　辞

この研究を行うにあたり，御指導いただきました富山医科薬科大学　和漢薬研究所　病態生化学部門　荻田善一教授に深謝致します。

参考文献

1) 上川　浩：Zymogen 活性化機構におよぼすオウバク成分の影響，家庭薬研究No.**5**，47－53 (1986)

2) 磯部正治，荻田善一：二次元電気泳動法によるマウス膵由来プロテアーゼ・ザイモーゲンの等電点決定法，生物物理化学，**27**，341－345 (1983)

3) Lowry, O. H., N. J. Rosenbraugh, A. L. Farr and R. J. Randall： Protein measurement with Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., **193**, 265－275 (1951)

4) Whittaker, M. ： Methods of Enzymatic Analysis, Vol. III, p.52, Verlag Chemie, Weinheim (1983)

5) Ulrichova, J., D. Walterova, V. Preininger, J. Slavik, J. Lenfeld, M. Cushman and V. Simanek : Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by some Isoquinoline Alkaloids, Planta Medica, **48**, 111－115 (1983)

家庭薬研究 No.6 57（1987）

〔原　著〕

数種の生薬エキスによるラットレンズアルドースリダクターゼ活性に対する阻害作用の検討※

前古　豊 Yutaka ZENKO　田中良一 Ryoichi TANAKA　黒瀬映子 Eiko KUROSE
櫨　彰 Akira HAJI
東亜薬品株式会社　試験開発部※※

白内障（しろそこひ）は種々の原因により水晶体に混濁が生じるものである。現在，糖尿病性合併症として糖尿病性白内障及び，老人性白内障が大部分を占め，きわめて重要な問題となっている。

糖の代謝系では，通常グルコースなどの糖の大部分は解糖系のヘキソキナーゼにより分解されTCA回路へと運ばれてゆくが，その一部は，ポリオール系の代謝を受ける。グルコースはアルドースリダクターゼ（AR）によりソルビトールに，さらにソルビトールはソルビトールデヒドロゲナーゼ（SDH）によりフルクトースへと分解されてゆく。しかしながら，糖尿病による高血糖状態では，解絡系の糖代謝は言うまでもなく，ポリオール系の代謝も活性化する[1)]。このため，ARの多く存在する水晶体内では，ソルビトールが蓄積し易くなり，蓄積したソルビトールは水晶体外へ排出されないため，水晶体内の浸透圧，電解質量及び，含水量の上昇や，レンズ内のグルタチオンの減少を誘起させ，さらに他の酵素系や代謝系の平衡異常をおこす。そして，これらの原因により水晶体蛋白質の変性が生じ，レンズが白濁し，最終的には糖尿病性白内障に移行する[2)]。

老人性白内障は，一般に加齢による老人性変化として白濁が生じる[3)]といわれているが，近年，加齢によってAR活性は変化しない[4)]が，SDH活性は低下することが，ラットを用いた実験で報告されており[5)]，このSDH活性の低下によるレンズ内でのソルビトールの蓄積が原因の一つと推察される。

以上のようにAR活性を阻害することが，糖尿病性さらには老人性白内障の予防もしくは治療手段として有効と考えられる。

一方，AR活性の阻害物質として多数のフラボノイド誘導体が報告され，生薬含有のフラボノイドにも高い阻害作用のあることが確認されている[6) 7)]。

そこで，今回，従来より「目に効く」又は，「白内障に良い」として用いられてきた数種の単味生薬や漢方処方[8) 9)]，さらには，フラボノイドを含む生薬[10)11)]に注目し，それらのエキスによるラットレンズAR（RLAR）活性阻害作用を検討したので報告する。

実験方法

1)　Sampleの調製方法

Sampleの漢方処方エキスまたは，単味生薬エキスのうち乾燥紛末エキスはそのままで，抽出エキスまたは軟稠エキスは，減圧乾燥または凍結乾燥の後，Dimethyl Sulfoxide（DMSO）で終濃度1×10^{-6}g/ml〜5×10^{-5}g/ml（DMSOは反応液中の濃度で1％）になる様溶解希釈して用いた。

※　第6回家庭薬開発研究会シンポジウム発表（富山，1986年11月7日）.
※※　〒939−05　富山市三郷26　　TEL　0764（78）5100

尚，溶媒として用いたＤＭＳＯは１％の濃度で全くＡＲ活性阻害作用を示さなかった。

2) ＡＲ粗酵素液の調製

七週齢，Wistar 系の雄ラット（約250g）を頸椎脱臼させ，両眼から水晶体を摘出し，酵素保存液（0.1M phosphate buffer, 1mM NADP, 1mM 2－Mercaptoethanol, pH 6.8, at 0℃）に入れ，－28℃で保存した。約400個の水晶体を集め，ホモジナイズし，0℃，15分間，10,000×gで遠心分離した後，この上澄みのＡＲ活性を測定し，酵素濃度が1.6～1.9 units になる様に酵素保存液で希釈した。これを，サンプル管に各1.5mℓづつ分注し，－28℃で保存したものを適宜取り出して実験に用いた。

尚，操作は0℃～4℃で行った。

3) ＡＲ活性阻害作用の測定方法

ＡＲ活性の測定は，ダブルビーム分光光度計を使用し，ＮＡＤＰＨがＮＡＤＰに酸化されて消失する$\lambda = 340$ nmの吸光度を200秒間測定した。

1mℓ用石英マイクロセルを用い，対照側には反応基質として，dℓ－Glycelaldehyde の入った(+) Buffer（0.1M phosphate buffer, 0.1mM NADPH, 10mM dℓ－Glycelaldehyde, pH6.2, at 25℃）を，試料側には基質の入っていない(－) Buffer（0.1M phosphate buffer, 0.1mM NADPH, pH 6.2, at 25℃）を各 970μℓ づつ入れ，更に，Sample を各10μℓ とＡＲ粗酵素液を各20μℓ加え，ピペッティングによる攪拌の後，酵素を加えてから約1分後に測定を開始した[12]。

(4) ＡＲ活性阻害率の算出法

ＮＡＤＰＨは時間に依存して自己解離を起こすので，BlankのNADPHの吸光度は時間とともに低くなる，そこで，ＮＡＤＰＨの自己解離曲線を求め，Sample 適用後のＮＡＤＰＨの吸光度と，その時間における Blank のNADPHの吸光度よりＡＲ活性阻害率（Inhibitory Rate：I. R.）を算出した。

$$I.R. = As / Ab \times 100 \quad (\%)$$

As：Sample 適用時のＮＡＤＰＨの吸光度

Ab：Sample 適用時のBlank のＮＡＤＰＨ吸光度

阻害率を片対数グラフにプロットしてグラフより各生薬エキスの IC_{50} を読みとった。

結果及び考察

ＡＲ活性阻害作用測定の結果，漢方処方エキスの中で，糖尿病性及び，老人性白内障に用いられる八味地黄丸[8]は，その乾燥エキスにおいて 5×10^{-5} g/mℓの濃度で31.1％のＡＲ活性阻害作用を示した。八味地黄丸中の桂皮には $IC_{50} = 7.6\times10^{-6}$ g/mℓのＡＲ活性阻害作用はあるが，地黄をはじめとする他の7種類は，単味ではほとんどＡＲ活性阻害作用を示さないことが報告されている[13]。

また，古来より目の治療に用いられてきた漢方処方[8]のうち，三黄瀉心湯乾燥エキスは $IC_{50} = 1.3\times10^{-5}$ g/mℓ，防風通聖散乾燥エキスは $IC_{50} = 4.9\times10^{-5}$ g/mℓだった。（Table 1，Fig 1－a）

単味の生薬エキスに関しては，菊花で $IC_{50} = 4.4\times10^{-6}$ g/mℓ と高いＡＲ阻害作用を示し，以下，蔓荊子は $IC_{50} = 5.3\times10^{-6}$ g/mℓ，枸杞は $IC_{50} = 2.0\times10^{-5}$ g/mℓであった（Table 1，Fig 1－b）

さらに，フラボノイドを含むことが知られている単味の生薬エキスにおいては，密蒙花が $IC_{50} = 2.2\times10^{-6}$ g/mℓと高いＡＲ活性阻害作用を示し，以下，甘茶が $IC_{50} = 5.6\times10^{-6}$ g/mℓ，谷精草が $IC_{50} = 5.8\times10^{-6}$ g/mℓ及び，槐花が $IC_{50} = 6.2\times10^{-6}$ g/mℓであった（Table 1，Fig 1－c）。

Table 1 : Inhibitory Effects of Crude Extracts on RLAR

	Sample	Inhibitory Rate (%)				IC_{50}
		5×10^{-5}g/ml	1×10^{-5}g/ml	5×10^{-6}g/ml	1×10^{-6}g/ml	(g/ml)
漢方処方	八味地黄丸乾燥エキス	31.1	−	−	−	−
	大黄甘草湯乾燥エキス	77.4	50.8	24.4	−	1.0×10^{-5}
	葛根湯乾燥エキス	40.8	−	−	−	−
	防風通聖散乾燥エキス	76.0	42.8	31.9	−	1.4×10^{-5}
	三黄瀉心湯乾燥エキス	79.1	45.9	28.8	3.0	1.3×10^{-5}
	牛車腎気丸料エキス末	51.5	8.2	−	−	4.9×10^{-5}
目に効く単味生薬	菊花	84.8	82.1	52.0	27.5	4.4×10^{-6}
	蔓荊子	84.6	69.5	48.4	13.2	5.3×10^{-6}
	枸杞葉	74.1	31.2	25.0	−	2.0×10^{-5}
単味生薬	ハブ茶	55.2	−	−	−	−
	槐花	85.3	68.0	41.1	39.2	6.2×10^{-6}
	甘茶	86.4	62.2	47.2	39.2	5.6×10^{-6}
	葛根	44.7	24.5	14.6	−	−
	山薬	57.8	12.5	−	−	3.8×10^{-5}
	杜仲	86.1	52.2	26.0	17.7	9.4×10^{-6}
	谷精草	82.4	65.3	45.9	14.3	5.8×10^{-6}
	密蒙花	84.2	73.0	62.4	38.1	2.2×10^{-6}
動物性生薬	蜆エキス	−2.3	−	−	−	−
	鯉肉圧搾液	2.3	−	−	−	−
その他	シネラリヤ圧搾液	26.2	−	−	−	−
	ONO−2235	* (5X10^{-7})80.2, (1X10^{-7})74.0, (5X10^{-8})69.0, (1X10^{-8})24.5, (5X10^{-9})10.3				1.5×10^{-8}

*（ ）内は濃度 g/ml

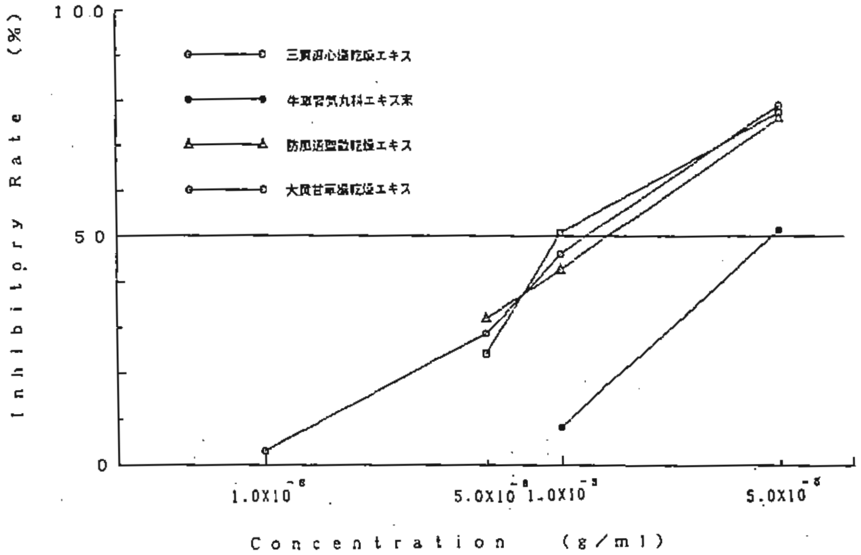


Fig 1−a : Inhibition Curve of Extract

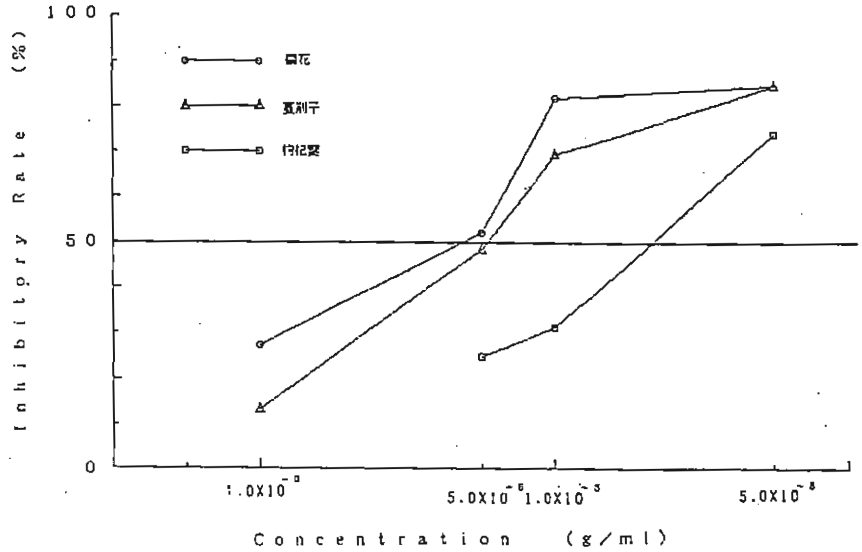


Fig 1−b : Inhibition Curve of Extract

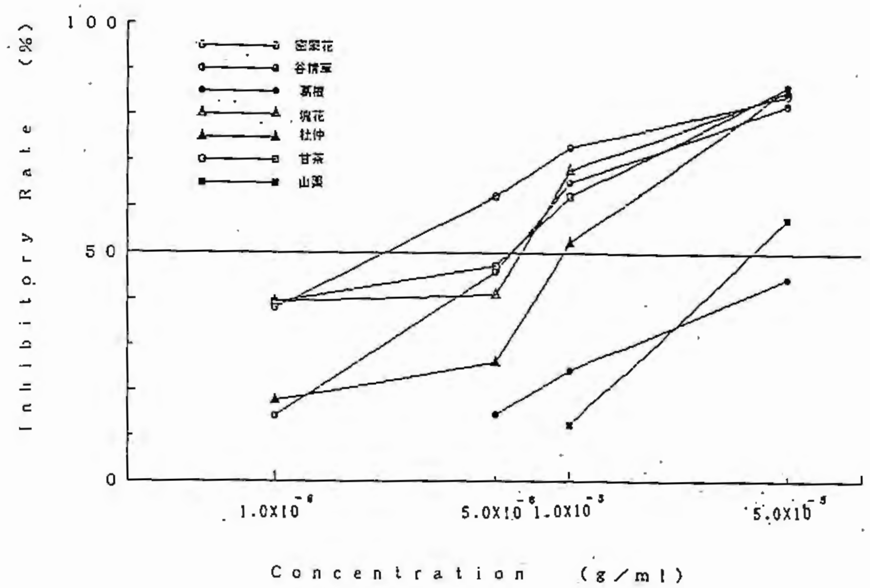


Fig 1 — c : Inhibition Curve of Extract

これらの強いＡＲ活性阻害作用を示した単味生薬や，漢方処方エキスの原料には以下に述べる様なフラボノイド化合物が含まれていることが知られている。密蒙花及び，三黄瀉心湯に配合された黄連にはacacetin[10]，蔓荊子はvitexicarpin[11]，三黄瀉心湯に配合される黄芩にはwogonin，baicalin，baicalein[11]，菊花にはapigenin−glucoside[11]，甘茶及び塊花にはquercetin，kaempferol，rutin[10]，枸杞にはrutin[10]である（Table 2）。

Table 2 : Flavonoids in Crude Drugs

単味生薬	Flavonoids	目に効く漢方処方
葛 根	daidzein, puerarin	葛 根 湯
塊 花	rutin, kaempferol, quercetin	
甘 茶	rutin, kaempferol, quercetin	
枸 杞	rutin	杞菊地黄丸・明目地黄丸
蔓荊子	vitexicarpin	滋腎明目湯・洗肝明目散
黄 芩	wogonin, baicalin, baicalein	三黄瀉心湯・防風通聖散・洗肝明目散
黄 連	acacetin	三黄瀉心湯・洗肝明目散
菊 花	apigenin-glucoside	洗肝明目散・杞菊地黄丸
密蒙花	acacetin	
桂 皮	flavan-3-ol-glucoside	八味地黄丸・牛車腎気丸・葛 根 湯
車前子	homoplataginin, plantaginin	牛車腎気丸

これらのフラボノイド化合物のうちいくつかについては，ＡＲ活性阻害作用を示すことが既に報告されており，今回の生薬エキスのＡＲ活性阻害作用は，含有されるフラボノイド化合物の作用で発現している可能性がある。

現在，強力なＡＲ阻害物質であるといわれているONO−2235は，本実験で$IC_{50} = 1.5 \times 10^{-8}$ g/ml

であった（Table 1）。しかし，ONO−2235 は精製された単物質であるため，生薬エキスとの比較はできないが，生薬エキスに含まれるＡＲ阻害物質も単離精製することにより強い阻害を示す可能性がある。

後発白内障の治療薬として用いられているシネラリア圧搾液は[14]，5×10^{-5} g/mlの濃度で，26.2％と弱いＡＲ活性阻害作用を示した（ Table 1 ）。このことから，シネラリア圧搾液の作用機序にＡＲ活性阻害作用はあまり関与しないと思われる。

古来より，目の薬として伝承されて来た動物性生薬（ 蜆エキス，鯉肉圧搾液 ）は本実験では全く作用を示さなかった（ Table 1 ）。八味地黄丸，枸杞，菊花及び蔓荊子などの眼科領域で広く使用されている生薬は，肝または，腎機能の改善に効力を示し，視力障害に有効と考えられている[8)9)]が，今回，これらの生薬はＲＬＡＲ活性阻害作用を示し，肝，または腎に対する作用のみならず，直接眼の酵素に作用して白内障の予防または，治療に効果を示している可能性がある。

現在，我々は白内障の治療に使用されている漢方処方エキスのうち強いＲＬＡＲ活性阻害作用を示した生薬についてカラム分画を試み，それぞれの分画のＡＲ阻害作用を検討している。

本研究では，in vitro で数種の生薬のＲＬＡＲ活性に対する阻害作用を検討したものである。in vivo において，既に，ウサギやラットを用いて，sorbinil[15] や tolrestat[16]の検討が進んでいるが，これら薬物の阻害作用を検討するだけでなく，点眼薬では薬物の結膜嚢内滞留時間や角膜透過性が，内服では，薬物の血中濃度や水晶体への移行率が重要な問題となる[17]。今後これら薬物の bioavailability に関する問題及び，実験動物の白内障モデルを用いての詳細な検討が必要である。

本研究にあたり，御指導を賜った富山医科薬科大学・薬学部・薬用資源学講座の清水岑夫助教授，ならびに薬用資源学講座の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

1) 坂本信雄，堀田暁． Aldose Reductase 阻害剤とその臨床応用。ファルマシア，**19**;43−47.（1983）.

2) 福士　克，樺澤　泉，船橋正員．アルドース還元酵素阻害剤−糖尿病性合併症の新治療剤にみられる最近の進歩．眼科，**24**; 1165−1171．（1982）.

3) 戸張幾生．老人性白内障．あたらしい眼科，**1**; 35−40．（1984）

4) Cao Danh, H., M. S. Benedetti, A. Mousset and P. Pasquier-Bechet. Age-related changes in the activities of the amine metabolising enzymes of rat eye. J. Pharm. Pharmacol. **36**（sappl.）, 270w.（1984）.

5) Cao Danh, H., M. S. Benedetti and P. Dostert. Age-related changes in sorbitol dehydrogenase activity of rat brain, liver, kidney and eye. J . Pharm. Pharmacol. **37**; 910-912 .（1985）.

6) Shimizu. M., T. Ito, S. Terashima, T. Hayashi, M. Arisawa, N. Morita, S. Kurokawa, K. Ito and Y. Hashimoto. Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids. Phytochemistry. **23**; 1885−1888.（1984）

7) Chandhy, P. S., J. Cabreda, H. R. Julianni anb S. D. Varma. Inhibition of human eyes aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. Biochem. Pharmacol. **32**;1995-1998. (1984)

8) 顔焜熒. 図解常用漢方処方, 薬業時報社. (1978)

9) 矢數道明. 臨床応用・漢方処方解説, 創元社. (1969).

10) 森田直賢. 薬用植物, 主婦の友社. (1980).

11) 難波恒雄. 原色和漢薬図鑑 (上) (下), 保育社. (1980).

12) Kador, P. F., L. O. Merola and J. H. Kinoshita Differences in the susceptiblity of various aldose reductases to inhibition. Docum. Ophthal. Proc. Series. **18** ; 117−124. (1979).

13) 清水岑夫, 寺島恵, 堀江俊治, 和田修治, 吉崎正雄, 森田直賢. ALDOSE REDUCTASE 阻害活性天然物質・第2報 (その2) サツマイモおよびベニノキ葉の活性分画について. 日本薬学会第105年会講演要旨集. 金沢; pp. 468. (1985).

14) 三島済一, 真鍋禮三, 深道義尚, 湖崎 弘. シネラリヤ点眼薬の薬効−二重盲検による白内障嚢外法術後の残存皮質吸収に及ぼす効果の調査−日本の眼科. **52**; 389-400. (1977)

15) Beyer-Mears, A., K. Kelly, and E. Cruz. Synergism of sorbinil and normal diet on reversal of Stage-II sugar cataract. Phalmacology. **31** ; 170-179. (1985).

16) Simard- Duquesne, N., E. Greselin, J. Dubuc and D. Dvornik. The effects of a new aldose reductase inhibitor (Tolrestat) in galactosemic and diabetic rats. Metabolism. **34**; 885−892. (1985).

17) 開繁義. 点眼剤の開発と製造上の問題点. 製薬工場. **6**; 386−390. (1986).

家庭薬研究 No.6　63（1987）

〔原　著〕

点眼剤中の塩酸ジフェンヒドラミン及びメチル硫酸ネオスチグミンの同時定量法※

明官紳一　寺西昌明
Shin'ichi MYOKAN　Masaaki TERANISHI
テイカ製薬株式会社　開発部※※

点眼剤中の有効成分である塩酸ジフェンヒドラミン及びメチル硫酸ネオスチグミンの定量は比色法[1)〜3)]では同時に2成分が配合された場合や，他の妨害成分などの配合により定量値が過大値となるため適当な前処理を必要とし，定量操作を煩雑なものとしていた。点眼剤中の有効成分の定量では，他の剤形に比べて添加剤等の影響は比較的少なく，そういった面では直接試料を注入して測定するＨＰＬＣ法を用いるのに最も適した剤形であると言える。筆者らはこれらの点を考慮し，塩酸ジフェンヒドラミン及びメチル硫酸ネオスチグミンを配合した点眼剤について，その同時定量法を検討し，比較的短時間に精度よく定量する条件を確立した。また点眼剤に繁用される他の成分等が及ぼす妨害についてもあわせて報告する。

実験の部

1. 標準品及び試料

1) 標準品

塩酸ジフェンヒドラミン標準品：日局塩酸ジフェンヒドラミンをエタノールで再結晶した後，105°で3時間乾燥する。含量99.0%以上

メチル硫酸ネオスチグミン標準品：日局メチル硫酸ネオスチグミンをエタノール＋エーテルで2回再結晶した後105°で3時間乾燥する。含量99.0%以上

2) 試　料

モデル処方（Table 1）に基づき調製したもの

Table 1　モデル処方

成　分　名	含量（mg）
塩酸ジフェンヒドラミン	20
メチル硫酸ネオスチグミン	5
酢酸トコフェロール	20
アミノエチルスルホン酸	500
コンドロイチン硫酸ナトリウム	100
ホウ酸	1500
ホウ砂	70
l−メントール	3
溶解剤	100
防腐剤	20
滅菌精製水	適量
全　量	100ml

2. ＨＰＬＣ条件

カラム：ラジアルパックマイクロボンダパックC_{18}（ウォーターズ社製，8㎜ ID×10㎝，粒径10μ）

カラム温度：常　温

移動相：0.01Mリン酸二水素カリウム・アセトニトリル混液（45：55）

※　第6回家庭薬開発研究会シンポジウム　（富山，1986年11月7日）

※※ 〒930　富山市荒川250　　TEL　0764（31）8881

検出波長：260 nm

流　　速：2 mℓ/min

3. 内標準溶液の調製

アセナフテン（和光特級）55mgを量り，アセトニトリルを加えて100 mℓとする。この液4 mℓを量りアセトニトリルを加えて100 mℓとする。

4. 標準溶液の調製

塩酸ジフェンヒドラミン標準品100 mg及びメチル硫酸ネオスチグミン標準品25mgを量り，水を加えて正確に500 mℓとする。この液5 mℓを量り，内標準溶液3 mℓを加え，更に水を加えて10mℓとし標準溶液とする。

5. 試料溶液の調製

試料5 mℓ（塩酸ジフェンヒドラミン1 mg，メチル硫酸ネオスチグミン0.25mg対応量）を量り，内標準溶液3 mℓを加え，更に水を加えて10mℓとし，試料溶液とする。

6. 定 量 法

標準溶液及び試料溶液120 μℓずつをＨＰＬＣに注入し，得られたクロマトグラムの内標準物質に対する塩酸ジフェンヒドラミン及びメチル硫酸ネオスチグミンのピーク面積比を求め含量を算出する。

結果及び考察

1. ＨＰＬＣ条件の検討

移動相は0.01Ｍリン酸二水素カリウムを添加した水・アセトニトリル混合溶媒とする逆相分配クロマトグラフィーを用い，カラムは逆相用充填剤として一般的なウォーターズ社製のラジアルパックマイクロボンダパックC_{18}を用いた。移動相のアセトニトリル濃度を50%から65%まで検討し各ピークのK′を算出した（Fig 1）。

この結果から各有効成分の分離が良好で溶出時間も適当である0.01Ｍリン酸二水素カリウム・アセトニトリル混液（45：55）を移動相と決めた。

標準溶液及び試料溶液より得られたクロマトグラムをFig 2に示す。

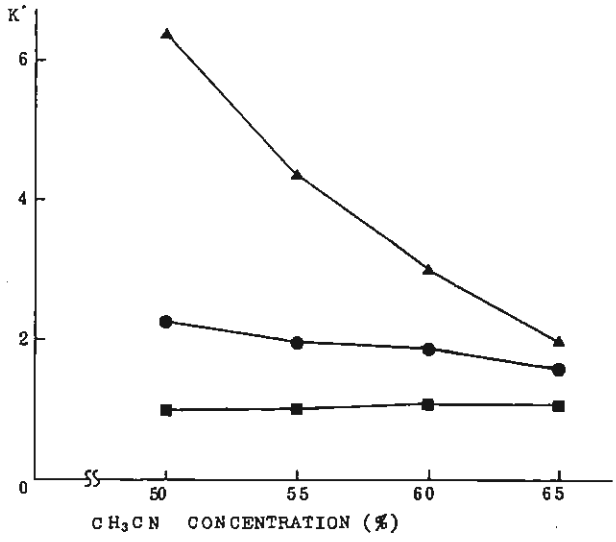


Fig 1 Effect of acetonitrile concentration on chromatogram of diphenhydramine hydrochloride, neostigmine methylsulfate and acenaphthene

● diphenhydramine
■ neostigmine
▲ I. S. (acenaphthene)

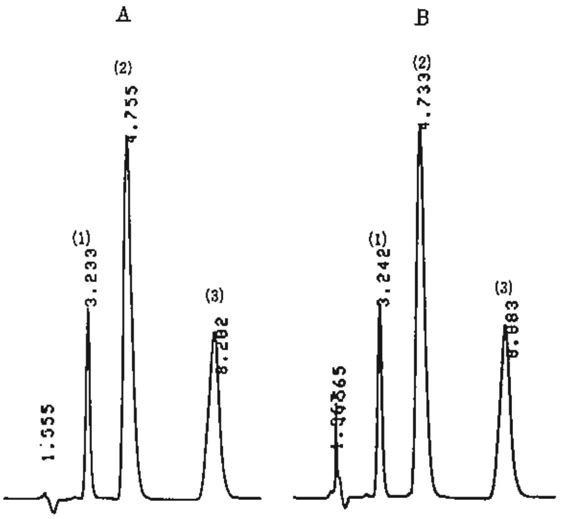


Fig 2 Chromatogram of diphenhydamine hydrochloride, neostigmine methylsulfate and acenaphthene

A) standard　　B) sample
(1) neostigmine
(2) diphenhydramine
(3) I. S. (acenaphthene)

2. 検 量 線

塩酸ジフェンヒドラミン 200 μg/mℓ以下及びメチル硫酸ネオスチグミン 50 μg/mℓ以下で作成した検量線はいずれも原点を通る良好な直線性を示し，相関係数はいずれも 0.999 以上であった（Fig 3，4）。

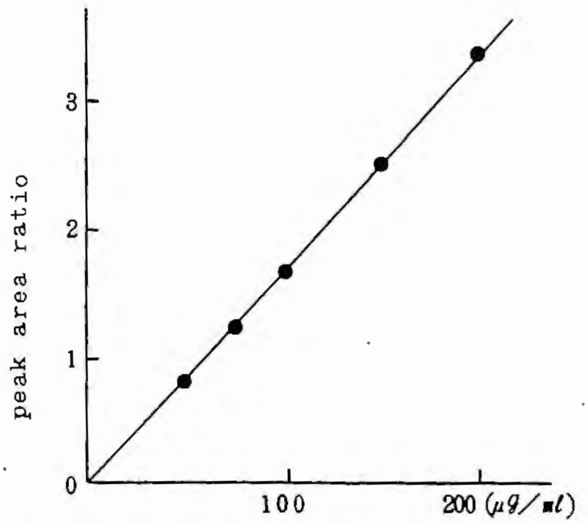


Fig 3 Calibration curve of diphenhydramine hydrochloride

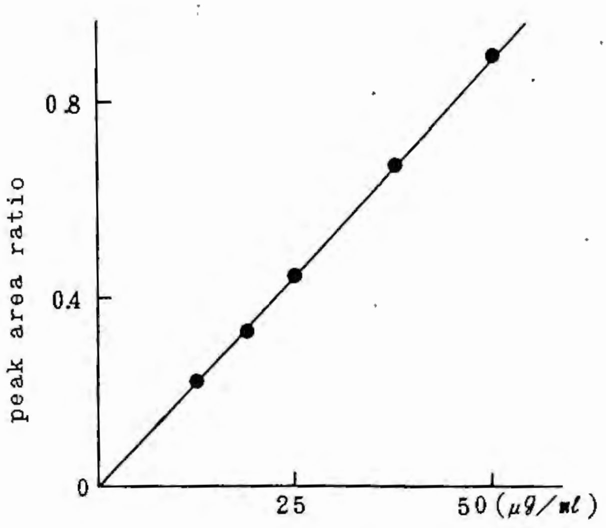


Fig 4 Calibration curve of neostigmine methylsulfate

3. 添加回収試験

含量既知の試料溶液に塩酸ジフェンヒドラミン標準品及びメチル硫酸ネオスチグミン標準品を添加したときの回収率を検討した。

いずれの成分もほぼ 100 %の回収率を得た（Table 2）。

Table 2 Recovery of diphenhydramine hydrochloride and neostigmine methylsulfate added to the sample

diphenhydramine		neostigmine	
Added(μg/ ml)	Recovery(%)	Added(μg/ ml)	Recovery(%)
25.05	99.5	6.21	100.1
50.10	99.8	12.42	100.6
75.15	100.1	18.63	100.7
100.20	101.2	24.84	101.8

4. 製剤への適用

モデル処方にしたがって調製した製剤について定量を行った（Table 3）。

これらの結果から製剤中の塩酸ジフェンヒドラミン及びメチル硫酸ネオスチグミンの同時定量が極めて精度よく定量でき，CV 値はいずれも 1 %以内であった。

Table 3 Determination of diphenhydramine hydrochloride and neostigmine methylsulfate in eye drops

Sample No.	Content in sample(%)		Average (%)	
	diphenhydramine	neostigmine	diphenhydramine	neostigmine
1	99.2	98.9	99.6	99.7
	99.8	99.8		
	99.8	100.5		
2	99.0	98.9	99.7	99.8
	100.0	99.8		
	100.1	100.7		
3	100.9	100.0	100.6	100.3
	100.5	100.3		
	100.4	100.5		

妨害成分の検討について

1. 試験方法

本定量法が点眼剤を対象としたものであることから，眼科用薬製造（輸入）承認基準[4]に収載された有効成分及び一般点眼薬に繁用される防腐剤についていずれもその配合される最大濃度を注入した場合の本定量法における保持時間，妨害の有無について検討した。

定量を妨害しないものを○，妨害するものを×，また移動相のアセトニトリル比を変えK′を変動させることにより分離できると考えられるものを△とした。

2. 結　果

これらの結果をTable 4，5に示す。塩酸ジフェンヒドラミン及びメチル硫酸ネオスチグミンの同時定量を妨害しない成分はイプシロンアミノカプロン酸，アラントイン，硫酸亜鉛，乳酸亜鉛，シアノコバラミン，パンテノール，パントテン酸カルシウム，パントテン酸ナトリウム，酢酸トコフェロール，L－アスパラギン酸マグネシウム・カリウム，アミノエチルスルホン酸，コンドロイチン硫酸ナトリウム，塩化ベンザルコニウム，塩化ベンゼトニウム，クロロブタノールであった。またパラベン類についてはすべてメチル硫酸ネオスチグミンのピークに妨害を与え，これらが共存する場合は本法は利用できなかった。

Table 4　承認基準収載有効成分の液体クロマトグラフィー

欄	成分名	260nm吸収(Abs)	保持時間(min)	ジフェンヒドラミンの定量	ネオスチグミンの定量	内標準物質への妨害
A	エピネフリン	0.04	1.7	○	×	○
	塩酸エフェドリン	0.34	2.6	○	×	○
	塩酸ナファゾリン	0.03	3.5	○	×	○
	硝酸ナファゾリン	0.19	3.3	○	×	○
	dl−塩酸メチルエフェドリン	0.36	2.9	○	×	○
B	メチル硫酸ネオスチグミン	0.03	3.2	○	−	○
C	イプシロン−アミノカプロン酸	0.01	1.7	○	○	○
	アラントイン	0.02	1.8	○	○	○
	塩化ベルベリン	OVER RANGE	5.2	×	○	△
	硫酸ベルベリン	OVER RANGE	5.2	×	○	△
	アズレンスルホン酸ナトリウム	2.20	2.1	○	△	○
	グリチルリチン酸二カリウム	OVER RANGE	2.0	△	×	○
	硫酸亜鉛	0.00	−	○	○	○
	乳酸亜鉛	0.00	−	○	○	○
	塩化リゾチーム	3.60	4.0	×	×	×
D	塩酸ジフェンヒドラミン	0.37	4.8	−	○	○
	マレイン酸クロルフェニラミン	2.18	4.4	×	○	○
E	フラビンアデニン ジヌクレオチドナトリウム	OVER RANGE	1.3	○	×	○
	シアノコバラミン	0.93	2.0	○	○	○
	塩酸ピリドキシン	2.35	2.1	×	×	×
	パンテノール	0.00	−	○	○	○
	パントテン酸カルシウム	0.00	−	○	○	○
	パントテン酸ナトリウム	0.00	−	○	○	○
	酢酸トコフェロール	0.23	2.2	○	○	○
F	L−アスパラギン酸マグネシウム・カリウム（等量混合物）	0.05	1.5	○	○	○
	アミノエチルスルホン酸	0.00	−	○	○	○
	コンドロイチン硫酸ナトリウム	0.01	1.1	○	○	○
G	スルファメトキサゾール	OVER RANGE	2.6	×	×	×
	スルファメトキサゾールナトリウム	OVER RANGE	2.3	×	×	×

Table 5　一般点眼薬の防腐剤の液体クロマトグラフィー

成分名	260nm吸収(Abs)	保持時間(min)	ジフェンヒドラミンの定量	ネオスチグミンの定量	内標準物質への妨害
塩化ベンザルコニウム液 50%	0.05	−	○	○	○
塩化ベンゼトニウム液 10%	0.01	−	○	○	○
クロロブタノール	0.00	−	○	○	○
パラオキシ安息香酸エチル	OVER RANGE	2.9	○	×	○
パラオキシ安息香酸ブチル	OVER RANGE	3.9	×	×	○
パラオキシ安息香酸プロピル	OVER RANGE	3.3	○	×	○
パラオキシ安息香酸メチル	OVER RANGE	2.6	○	×	○

考　察

今回我々は塩酸ジフェンヒドラミン及びメチル硫酸ネオスチグミンの同時定量について報告したが，「多数の製品に共通して利用することが可能な定量法」を確立することを目指し，本法に影響を与える他成分を明らかにできたので，今後定量を検討する際や品質管理，製剤開発に役立てたい。

結　論

1. 点眼剤中の塩酸ジフェンヒドラミン及びメチル硫酸ネオスチグミンの同時定量法を確立し，品質管理面に供することができた。
2. 本法の妨害因子等について検討し，今後の基礎資料として有用と考えられた。

文　献

1) 井上哲男，立沢政義：医薬品研究，3，87（1972）

2) 井上哲男，立沢政義：医薬品研究，4，132（1973）

3) 井上哲男，立沢政義，木船絃彦：衛生化学，18，374（1972）

4) 日本公定書協会，医薬品製造指針（1986），薬業時報社

家庭薬研究 No.6 69（1987）

〔原　著〕

漢方製剤の品質に関する研究（第1報）※

—— 平　胃　散 ——

成川一郎　西本初博　吉井美矢子
Ichiro NARIKAWA　Hatsuhiro NISHIMOTO　Miyako YOSHII
中田るり子　石田裕子
Ruriko NAKADA　Yuko ISHIDA
東亜製薬株式会社　試験研究室※※

平胃散は「朮4.0，厚朴3.0，陳皮3.0，大棗2.0，甘草1.0，乾生姜0.5～1.0」から成り，原方では「生姜，大棗以外は粉末とし，生姜片と乾燥大棗を二つ割りにしたものを加えて水で煎じた後，生姜，大棗は引き上げて残りを熱いうちに服用する。」か，又は食前に服用する場合は「生姜，大棗以外の生薬のみ粉末とし，食塩少々を加え，熱湯にといて熱いうちに服用する。」[1]とされている。

しかし現時点では一般に上記6種生薬の湯液又はエキス製剤として服用されている。

ところがこれら6種生薬中朮，原朴，陳皮，生姜は揮発性健胃成分を多く含み，湯液やエキス製剤の調製方法がその品質に影響を与えることが懸念される。今回，エキス製剤の調製方法と内容成分の動向について検討し，若干の知見を得たので報告する。

実験の部

1. 被験材料

(1) 平胃散構成生薬

○	朮（ジュツ）	4.0 g
○	厚朴（コウボク）	3.0 g
○	陳皮（チンピ）	3.0 g
	大棗（タイソウ）	2.0 g
	甘草（カンゾウ）	1.0 g
○	生姜（ショウキョウ）	0.5 g
	合計	13.5 g

○：芳香健胃成分を含む生薬

一般に市販されている生薬細切品を用いた。

(2) 平胃散エキス

① 30 v/v %エタノール製乾燥エキス

上記生薬の混合物13.5 g（1日量）に30 v/v %エタノール135 mlを加え，攪拌しながら約50°で1時間加温抽出する。その後，布ごしろ過し，抽出液は日局製剤総則2.エキス剤の製法を準用して40～50°で減圧濃縮した後，真空乾燥して製した。（収率　約26%）

※　第6回家庭薬開発研究会シンポジウム発表（富山，1986年11月7日）

※※ 〒930－03　富山県中新川郡上市町若杉55　　TEL　0764（72）1010

② 水製乾燥エキス

30v/v%エタノール製乾燥エキスのときと同じ生薬の混合物13.5 g（１日量）に水135 mlを加え，１時間還流する。その後，布ごしろ過し，30v/v%エタノール製乾燥エキスと同様に操作して製した。（収率　約33%）

平 胃 散 エ キ ス

水製乾燥エキス	30v/v%エタノール製乾燥エキス
平胃散原生薬に10倍量の水を加えて約100°で1時間還流抽出	平胃散原生薬に10倍量の30v/v%エタノールを加えて約50°で1時間加温抽出

↓

布ごし，遠心分離

↓

減圧下，40〜50°で濃縮

↓

40〜50°で真空乾燥（約30時間）

↓

収量の測定

(3) 平胃散エキス製剤

30v/v%エタノール製乾燥エキスを用いて製した顆粒剤

① 乾式造粒法[2)]による顆粒剤

30v/v%エタノール製乾燥エキスに賦形剤（乳糖，アビセル）を加え，乾式造粒法により製した顆粒剤

② 湿式造粒法による顆粒剤

30v/v%エタノール製乾燥エキスに①と同一賦形剤を同量加え，湿式造粒法により製した顆粒剤

2. 試験方法

(1) グリチルリチンの定量

① 試　料

30v/v%エタノール製乾燥エキス及び水製乾燥エキス

② 方　法

試料に希エタノールを加えて，１時間還流抽出した後，希エタノールを加え，一定量にした液を試料溶液としてＨＰＬＣにより定量した。

(2) ヘスペリジンの定量

① 試　料

30v/v%エタノール製乾燥エキス及び水製乾燥エキス

② 方　法

試料にメタノールを加えて，30分間還流抽出した後，メタノールを加えて一定量にした液を試料溶液として，ＨＰＬＣにより定量した。

グリチルリチンの定量方法

試料（カンゾウ0.15 g 相当量）

↓ 希エタノール約30mℓを加えて60分間還流抽出

希エタノールを加えて50mℓにメスアップ

↓

メンブランフィルターでろ過

↓

下記の条件でＨＰＬＣで定量

ＨＰＬＣ条件

カラム：LiChrosorb RP-Select B 4⌀×250㎜

移動相：1％ H_3PO_4・CH_3CN（65：35）

流　量：1.0mℓ/min　　温度：35°

測定波長：254 nm

ヘスペリジンの定量方法

試料（チンピ0.30 g 相当量）

↓ メタノール約80mℓを加えて30分間還流抽出

メタノールを加えて100mℓにメスアップ

↓

メンブランフィルターでろ過

↓

下記の条件でＨＰＬＣで定量

ＨＰＬＣ条件

カラム：ラジアルパック μ−BONDAPAK C_{18} 8⌀×100㎜

移動相：0.03M−KH_2PO_4・MeOH・CH_3CN（7：2：1）　pH 4.8

流　量：1.0mℓ/min　　温度：室温

測定波長：286 nm

(3)　エキス収率

平胃散水製乾燥エキス，30v/v％エタノール製乾燥エキス各々の収量よりエキス収率を求めた。

(4)　精油成分のパターン分析

①　試　料

平胃散構成生薬中　　　ジュツ，コウボク，ショウキョウ，チンピ

平胃散構成生薬末混合品，30v/v エタノール製乾燥エキス，水製乾燥エキス，乾式造粒法による顆粒剤，湿式造粒法による顆粒剤

②　分析方法

試料（１日量）に水200mℓを加えて，「日局」精油定量装置で抽出後（なお，キシレンの代りに酢酸エチルを用いた。），定量装置中の酢酸エチル層及び水層を取り出し，エーテルを用いて３回抽出した。抽出液は合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水した後，水浴中で溶媒を留去し，残留物をクロロホルム１mℓに溶解し，試料溶液とし，ＧＬＣで分析した。

パターン分析の方法

試料（１日量）

↓ 水200mℓを加えて精油定量装置で３時間抽出（キシレンに換えて酢酸エチルを用いた。）

定量装置中の酢酸エチル層及び水層を取り出し，エーテルで抽出し，エーテル層は脱水し，留去した。これをクロロホルム１mℓで溶解し，試料とした。

↓

下記の条件でＧＬＣで分析した。

ＧＬＣの条件

カラム：３％ＯＶ−17　２m　ガラスカラム

検出器：ＦＩＤ

温　度：120°10分間保持，5°/min で220°まで昇温，220°で10分間保持

3. 結　果

(1) エキス中のグリチルリチン量とヘスペリジン量

水製乾燥エキス及び30V/v%エタノール製乾燥エキス中のグリチルリチンとヘスペリジンの定量を行った結果については，Table 1に示した。これによればエキス1日量中のグリチルリチン含量は22～24mg，ヘスペリジン含量は37～40mgで両エキス間に差は認められなかった。

Table 1 エキスの比較

		水製乾燥エキス	30V/v%エタノール製乾燥エキス
1日量中のグリチルリチン定量値	1	22.3 mg	22.6 mg
	2	23.0 mg	23.5 mg
	3	22.9 mg	23.7 mg
	平均	22.7 mg	23.3 mg
1日量中のヘスペリジン定量値	1	37.2 mg	39.5 mg
	2	39.5 mg	39.6 mg
	3	37.5 mg	37.2 mg
	平均	38.1 mg	38.7 mg
1日量中のエキス収量	1	4.42 g	3.52 g
	2	4.39 g	3.58 g
	3	4.53 g	3.40 g
	平均	4.45 g	3.50 g

(2) 1日量中エキスの収量

原生薬1日量中から得られた水製乾燥エキスの収量は約4.5g，30V/v%エタノール製乾燥エキスの収量は約3.5gであった。

(3) 精油成分のGLCパターン比較

平胃散に配合されている生薬の中で精油成分の多いジュツ，コウボク，ショウキョウ，チンピについてGLCパターン比較を行った結果についてはFig 1に示した。ジュツ中の精油成分チャートにはβ－Eudesmolが保持時間約19分に認められ，その他15分，22分，23分，24分，29分にそれぞれ大きいピークが認められた。コウボク中の精油成分のチャートにはβ－Eudesmolが保持時間約19分に，Magnololが34分に，又Honokiolが40分に認められた。ショウキョウ中の精油成分のチャートにはGingerolが保持時間約36分のところに認められた。チンピ中の精油成分のチャートでは保持時間約19分に2個の大きいピークが認められた。

次に平胃散と各平胃散エキスの精油成分のGLCパターン比較をFig 2に示した。平胃散構成生薬末混合品のGLCパターンにはジュツ，コウボク，チンピ及びショウキョウ中の精油成分のピークが明らかに認められた。30V/v%エタノール製乾燥エキスと水製乾燥エキスのGLCパターン比較においては，30V/v%エタノール製乾燥エキスにかなりの精油成分の残存が認められたのに比較して，熱水抽出した水製乾燥エキスの場合は精油成分の損失が著しかった。

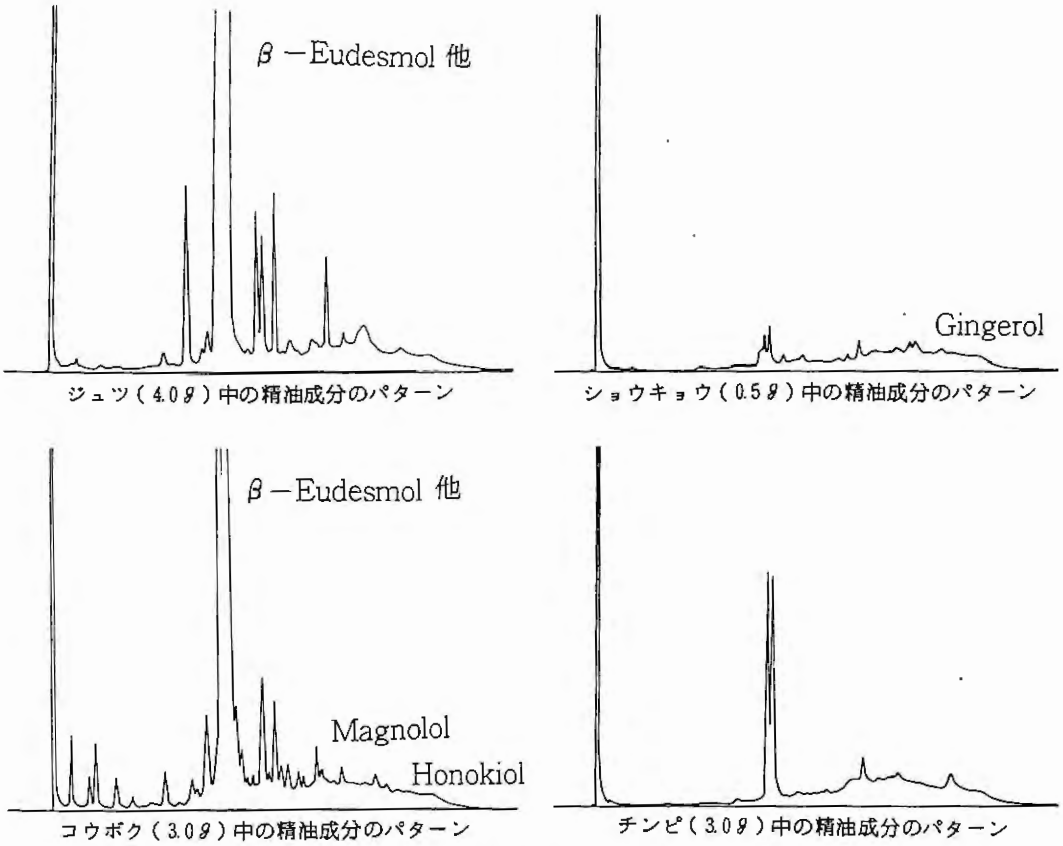


Fig 1　平胃散生薬の精油成分パターン

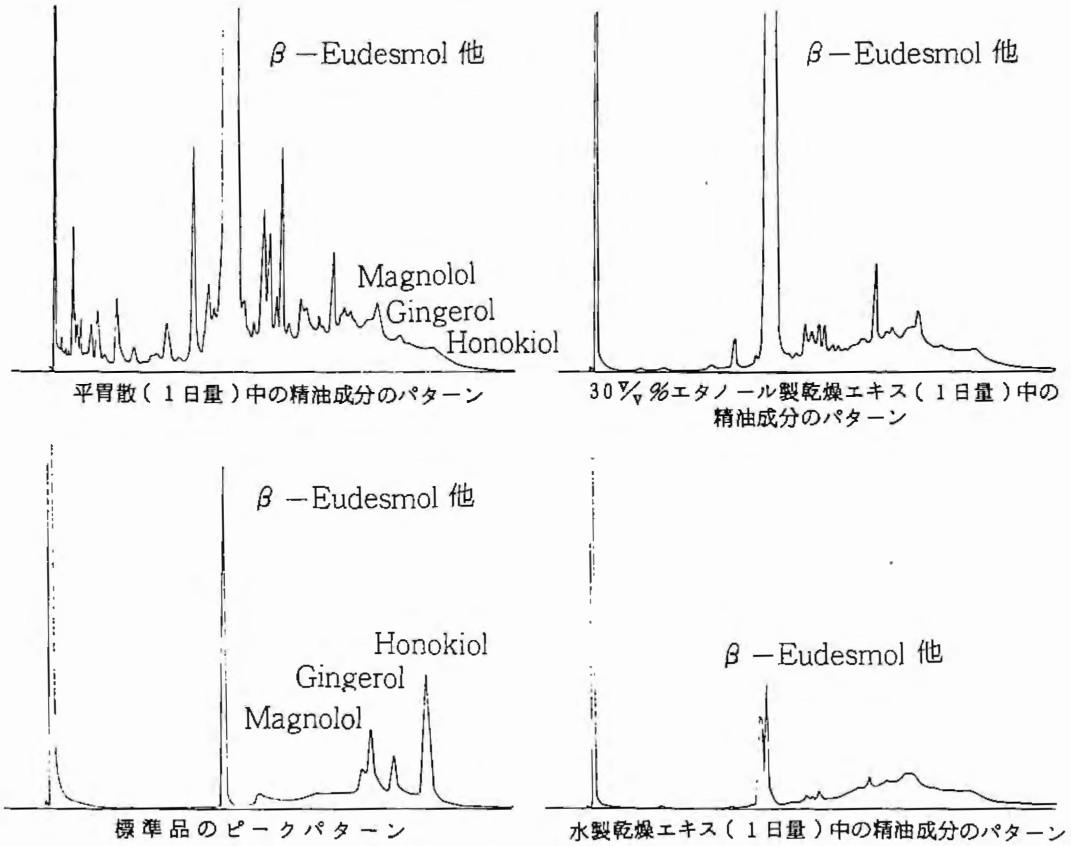


Fig 2　平胃散および平胃散エキスの精油成分パターン

Fig 3においては乾式造粒法と湿式造粒法による顆粒剤のＧＬＣパターンを比較した。乾式造粒法による顆粒剤の場合は原料エキスのそれと大差ないが，湿式造粒法による顆粒剤のパターンでは精油成分の損失が著しかった。

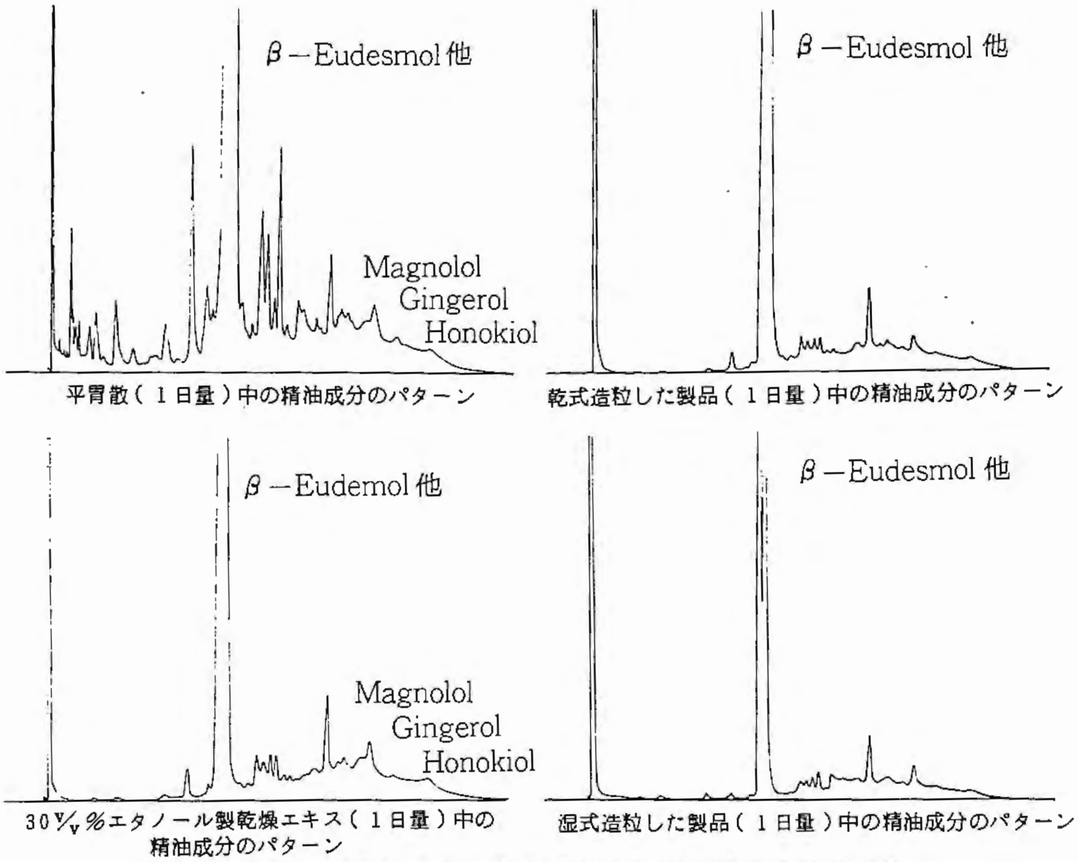


Fig 3　平胃散エキス製剤工程における精油成分の損失

考　察

本来「散」として用いられるべき平胃散には揮発性の健胃成分としての精油類を多量に含む朮，厚朴，陳皮，生姜が配合されている。平胃散のエキス製剤化に際して，これら精油成分の揮散損失を防ぐ目的から熱水抽出に代えて$30^{V}/_{V}$%エタノール抽出を行った。この場合エキス収率は熱水抽出時に比較して約７％減少するが，指標成分としてのグリチルリチン及びヘスペリジンの利用率には差が認められず，少なくとも$30^{V}/_{V}$%エタノールに可溶な成分に関しては熱水抽出時に対して遜色はないものと判断される。

しかし，精油成分のＧＬＣパターン分析によれば，$30^{V}/_{V}$%エタノール抽出の場合，低沸点分の損失は免れないながら，全体として精油成分の損失が少ないのに比較して，熱水抽出の場合はその大部分が損失し，抽出溶媒の違いによる残留精油量の差は著しかった。更に，この$30^{V}/_{V}$%エタノール抽出エキスを用いて製した顆粒剤においては，乾式造粒法では精油分の損失はほとんど認められなかったが湿式造粒法の場合は精油分の損失は著しく，エキス製剤の製造工程の如何が精油成分の残存率，ひいては平胃散の効果に多大の影響を及ぼすことは明らかである。

医薬品の製剤化に当っては，投与目的や投与経路或いは有効成分の特性を考慮した上で，より有用度を高めるべく最適の製剤設計がなされるべきであるが，漢方エキス製剤においても，当該処方の適応症や原生薬の特性を十分検討した上で最良の製剤工程を採用すべきであると考える。

参　考

1)　太平恵民和剤局方

2)　乾式造粒：粉末を加圧して板状とするか又は打錠した後破砕し，一定の大きさに整粒して造粒する方法。

（湿式造粒法では水又はアルコールで湿らせて造粒する。）

家庭薬研究 No.6　75（1987）

〔原　著〕

フルルビプロフェン含有貼付剤の基礎的研究※

元山　貢　杉林毅宏　成川佳美
Mitsugu MOTOYAMA　Takehiro SUGIBAYASHI　Yoshimi NARIKAWA
田添龍一
Ryuichi TAZOE
リードケミカル株式会社※※

整形外科領域をはじめとして各領域における抗炎症・鎮痛に繁用されている酸性非ステロイド性抗炎症薬は強力な抗炎症・鎮痛効果を有するが，その作用機序はプロスタグランジンの生合成阻害活性によるものとされ，従って効力の強さと血中濃度上昇に伴う消化管障害，浮腫等の全身性副作用の発現度は一般に相関関係にある。[1)]（Fig.1）

ところがこれら薬物の一般的用法としての内服においては，胃腸管から吸収されて後血中へ移行し，体循環を経て炎症局所へ至らしめるため血中濃度の上昇は必然的である。

そこで酸性非ステロイド性抗炎症薬を貼付剤として経皮適用することにより薬物を直接炎症組織内へ移行せしめ，効率的にその効果を発揮させるとともに，血中濃度を抑制することから全身性副作用の軽減が期待できるものと考えた。

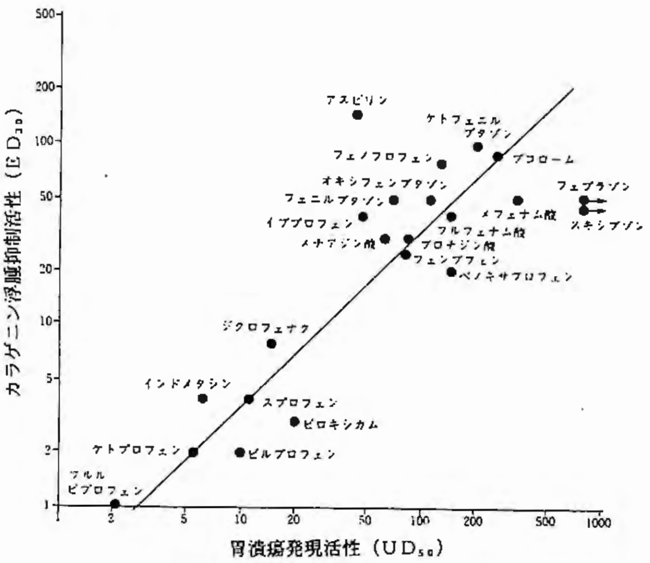


Fig. 1　非ステロイド抗炎症薬の抗浮腫作用と胃潰瘍発現作用との相関
“抗炎症薬一基礎と臨床一”から抜粋[1)]

以上の開発理念に基づき，酸性非ステロイド性抗炎症薬の中でも抗炎症効果が強力で経皮適用に適した特性を有するフルルビプロフェンについて内服剤から貼付剤への投与経路変更を試みた。

以下に本開発に関する基礎実験の中から抜粋して報告する。

実験方法

1. 実験材料

(1) 使用動物

Wistar 系ラットを1週間予備飼育後実験に供した。

(2) 被験薬物

ＦＰ－Ａ　：フルルビプロフェン（ＦＰ）を含有する貼付剤

ＦＰ経口　：ＦＰをアラビアゴム水溶液に懸濁したＦＰ経口投与用調製液

※　第6回家庭薬開発研究会シンポジウム発表　（富山，1986年11月7日）

※※ 〒930　富山市日俣77－3　　TEL　0764（25）1978

2. 試験方法

(1) ラット足蹠carrageenin誘発浮腫抑制作用

体重170〜190gのラットを1群10匹使用した。試験前日に剪毛したラット後肢足蹠に起炎剤として0.5% carrageenin水溶液0.1mlをwalking padの一つを通して注入した。起炎後直ちに0〜1.33%FP−A(3.5cm×4.0cm)を貼付し，3時間後に足蹠容積を測定し，起炎前の容積に対する浮腫率を求めた。

(2) FP−A貼付時のラットの血清中及び筋肉内FP濃度

実験前日に後肢下腿部被毛を剪毛したラット(152〜195g)を1群6匹として実験に供した。ペントバルビタール麻酔下0.083〜1.33%FP−A(2.0cm×5.0cm)をラット下腿部に貼付した。4時間後に屠殺して採血並びに貼付部直下の筋肉を採取し，液体クロマトグラフ法で血清中及び貼付部直下の筋肉内FP濃度を測定した。

(3) FP−A貼付並びにFP経口投与時のラットの血清中及び炎症組織内FP濃度

実験前日に背部被毛を剪毛したラット(150〜180g)を1群8匹として実験に供した。ラット背部に起炎剤としてcarrageenin水溶液を注入後直ちに0.33%FP−A(1.5cm×1.5cm)を貼付し，3時間後の血清中及び炎症組織内FP濃度を同用量のFP経口投与(0.66mg/匹)時と比較検討した。

3. 試験結果

(1) ラット足蹠carrageenin誘発浮腫抑制作用

carrageeninで発症させた炎症に対する効果はFP−A中のFP濃度に相関して増加し，0.17%FP濃度以上で基剤に対して有意な抑制効果を示し，またこの効果は0.33%FP濃度において定常状態となった。(Fig.2)

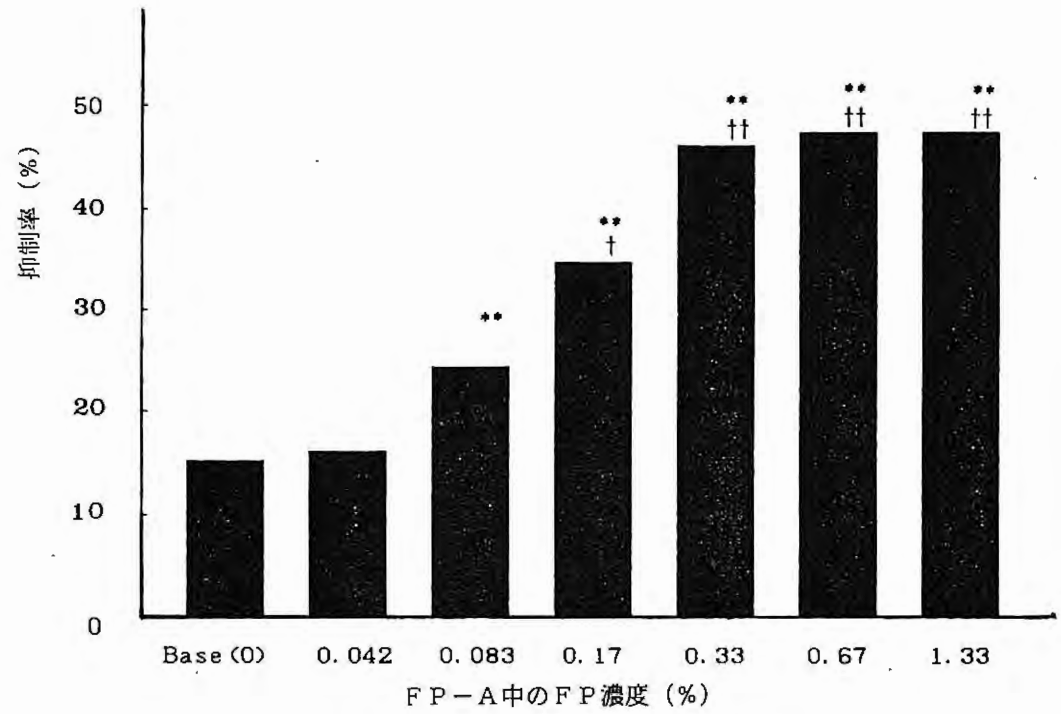


Fig.2 ラット足蹠carrageenin誘発浮腫抑制作用(n=10)
※※ P<0.01 contorolに対する有意差
† P<0.05，†† P<0.01 基剤に対する有意差

(2)　ＦＰ－Ａ貼付時のラットの血清中及び筋肉内ＦＰ濃度

ＦＰ－Ａ貼付時の貼付部直下の下腿部筋肉内ＦＰ濃度はＦＰ－Ａ中のＦＰ濃度に相関して増加し，この濃度は 0.33％ＦＰ濃度で定常状態に達した。一方血清中濃度はＦＰ濃度に相関して用量依存的に増加した。(Fig. 3，4)

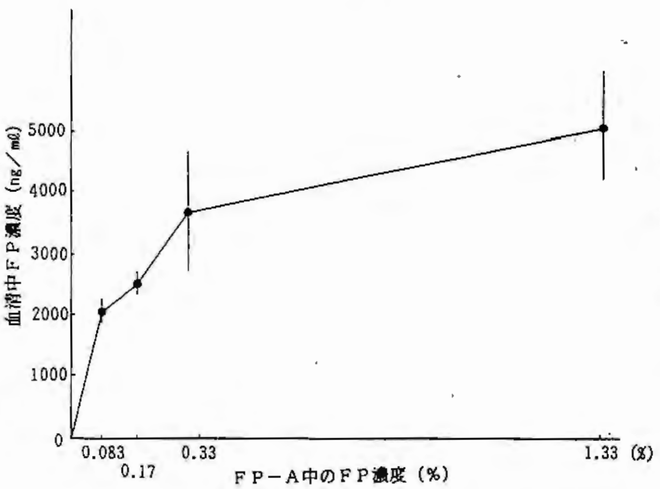


Fig.3　ラット下腿部にＦＰ－Ａ貼付後４時間の血清中ＦＰ濃度 (n＝6)

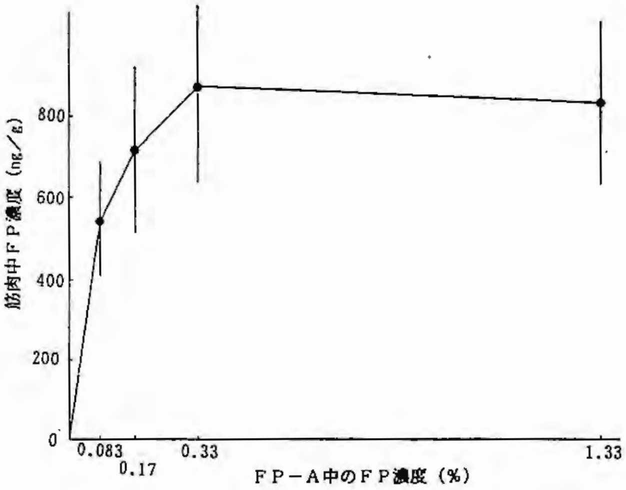


Fig.4　ラット下腿部にＦＰ－Ａ貼付後４時間の貼付部直下筋肉内ＦＰ濃度 (n＝6)

(3)　ＦＰ－Ａ貼付並びにＦＰ経口投与時のラットの血清中及び炎症組織内ＦＰ濃度

carrageeninで発症させた炎症部皮膚に 0.33％ＦＰ－Ａを貼付した場合の炎症組織内ＦＰ濃度はＦＰの同用量を経口投与した場合のそれとほぼ同等で，そのときの貼付投与群の血清中ＦＰ濃度は経口投与群のそれに比べて約１／６と低かった。(Fig.5)

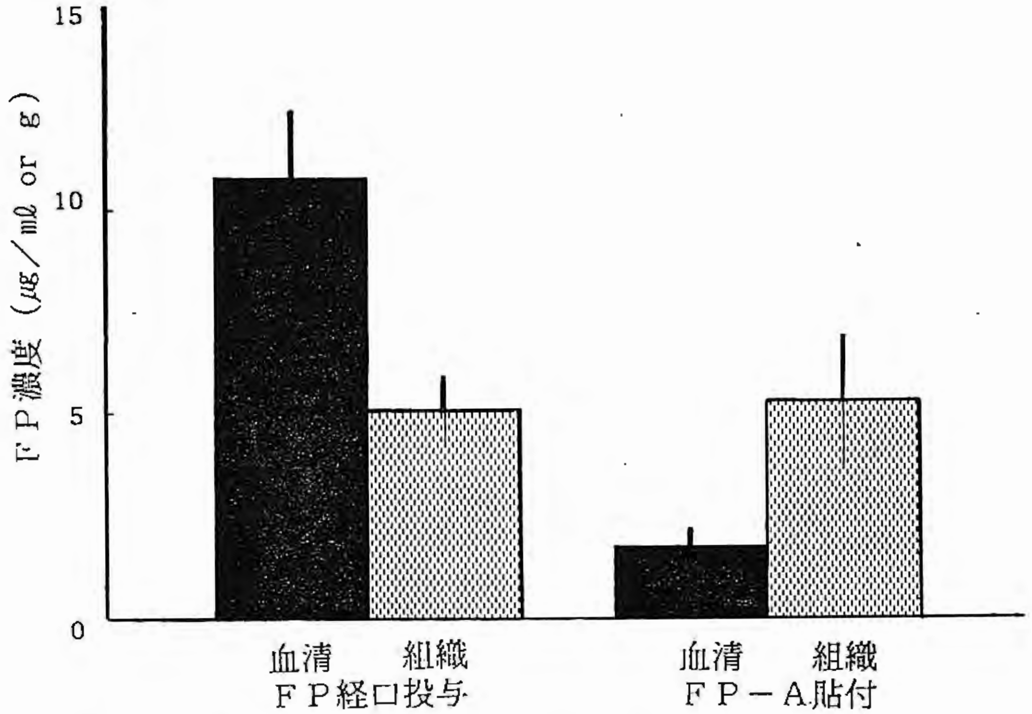


Fig.5　ラット背部皮膚carrageenin浮腫中並びに血清中ＦＰ濃度 (n＝8)

ま と め

酸性非ステロイド性抗炎症・鎮痛薬の副作用軽減を目的として開発されたＦＰ－Ａに関し，各種動物，各実験モデルにより実施した基礎実験によってその有用特性が確認されたが，今回は初期の基礎実験の中から抜粋して報告した。

ラット足蹠carrageenin誘発炎症に対する効果はＦＰ－Ａ中のＦＰ濃度に相関して増加し，この効果は0.33％ＦＰ濃度で定常状態に達し，また，ＦＰ－Ａ貼付部直下のラット下腿部筋肉内ＦＰ濃度も0.33％ＦＰ濃度で定常状態となったが，血清中濃度は0.33％ＦＰ濃度以上においてもＦＰ－Ａ中のＦＰ濃度に相関して増加し続けた。抗炎症・鎮痛薬の効果は炎症組織内の濃度に依存すると判断されるところから，以上の結果によれば0.33％以上の濃度増加による効果の増大は期待し難く，かえって血中濃度上昇に伴う副作用発現が示唆された。

これらの結果はその他の動物種あるいは他の炎症モデルに対する効果[2) 3) 4)]においても実証されており，また，安全性の面ではウサギでの皮膚刺激性試験[2)]，ヒトによるパッチテスト[5)]等の結果から，より高濃度においては安全性が低下する傾向が認められている。

また，ラットのcarrageenin誘発炎症背部に0.33％ＦＰ－Ａを貼付した場合の炎症組織内ＦＰ濃度は同用量を経口投与した場合のそれとほぼ同等であり,この場合のFP－A群の血清中FP中濃度は経口投与群に比べて著明に低かったが，ヒトにおいても同様の結果[6)]が得られている。その他ラットに貼付又は経口投与した場合のED_{50}並びにUD_{50}値の比から算出した安全指数の比較においてもＦＰの貼付剤化による安全性の著しい増大が確認されている[7)]。

以上により0.33％がＦＰ－Ａの製剤濃度として最適であり，ＦＰを貼付剤として経皮適用することにより，内服時と同等の効果が得られるとともに，全身性副作用が著明に軽減されるものと判断した。

文 献

1) 塩川優一，藤村一："抗炎症薬－基礎と臨床－" P41，医薬ジャーナル社

2) 北川晴雄 ら: Flurbiprofen の皮膚適用による抗炎症・鎮痛作用及び皮膚刺激試験，医薬品研究，**13**(4)，869 ，(1982)

3) 舛本省三 ら: Flurbiprofen 外用剤（FP－A）の抗炎症作用，医薬品研究，**13**(4)，879 ,(1982)

4) 久木浩平 ら: Flurbiprofen 外用剤（FP-A)の抗炎症作用－ハッカ油の効果と既存薬剤との比較試験，医薬品研究，**15**(2)，293，(1984)

5) 早川律子：ＦＡ－Ｐ各種濃度における皮膚安全性試験，社内報

6) 菅原幸子：フルルビプロフェン貼付剤（ＦＰ－Ａ）の経皮適用による患者関節液ならびに組織内濃度の検討， Therapentic Reserch，**6**(1)，289 (1987)

7) 元山貢 ら: フルルビプロフェン貼付剤(FP－A）の薬理学的研究，Therapentic Reserch，**6**(1)，333，(1987)